



**Luís Miguel Tortas**

**Caracterização de Integrões de classe 1 em  
*Pseudomonas aeruginosa***



**Luís Miguel Tortas**

**Caracterização de Integrões de classe 1 em  
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

À minha família

## **O júri**

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves  
Investigador Auxiliar CESAM

Prof.<sup>a</sup> Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso  
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À professora Doutora Sónia Mendo, do Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade de Aveiro, pela orientação técnico-científica, a crítica e as sugestões, os ensinamentos transmitidos e amizade.

Às colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade de Aveiro, pela entreaajuda, discussão de ideias e amizade.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital Infante D. Pedro Aveiro a cedência dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, sem os quais a realização deste estudo não teria sido possível.

À minha família e amigos pela sua compreensão, motivação e apoio incondicional que sempre me deram.

## palavras-chave

*Pseudomonas aeruginosa*, Integrões de Classe 1, Resistência a antibióticos

## resumo

*Pseudomonas aeruginosa* é um agente patogénico oportunista, sendo um dos principais agentes de infecção nosocomial em doentes imunodeprimidos.

O aumento da frequência de estirpes multi-resistentes de *P. aeruginosa* tem contribuído para o aumento da morbilidade e mortalidade de doentes hospitalizados. *P. aeruginosa* é resistente, de forma natural ou adquirida, a um grande número de antibióticos, devido a alterações da permeabilidade da membrana externa, mecanismos de efluxo, alteração das PBPs e produção de  $\beta$ -lactamases.

As  $\beta$ -lactamases são determinantes de resistência importantes, uma vez que estas enzimas hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, tornando-o inactivo. A presença de  $\beta$ -lactamases em estruturas genéticas móveis, como plasmídeos e integrões da classe 1, tem contribuído para a sua disseminação. Este estudo teve como objectivo a pesquisa e caracterização de integrons de classe 1 em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Foram analisados 42 isolados colhidos no Hospital Infante D. Pedro Aveiro, no período de Outubro de 2007 a Janeiro de 2008. A identificação e determinação dos perfis de susceptibilidade dos 42 isolados, foram executadas no sistema automatizado Vitek®2 da Biomerieux®. A pesquisa e caracterização de integrons de classe 1, foi efectuada pela técnica de PCR.

Integrões de classe 1 foram identificados em 14 isolados de *P. aeruginosa*. A amplificação das zonas variáveis e posterior determinação da sequência nucleotídica revelou a presença de 8 integrões distintos.

Em 3 isolados, foi detectada a presença do integrão In99, descrito em estudos anteriores realizados no mesmo hospital.

Os resultados deste trabalho alertam para a possibilidade de disseminação dos genes de metalo- $\beta$ -lactamases VIM-2, que foram identificados em integrons de 4 isolados de *P. aeruginosa* e mostram a prevalência do In99, o que sugere a sua disseminação na comunidade/ambiente hospitalar.

## keywords

*Pseudomonas aeruginosa*, Integrons of Class 1, Antibiotic Resistance

## abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen, it is the leading cause of nasocomial infections in patients with compromised immune defences. The increased frequency of multiresistant strains of *P.aeruginosa* has contributed to increase morbidity and mortality in hospitalized patients. The bacterium is naturally resistant to many antibiotics due to the permeability barrier afforded by its outer membrane, restricted uptake and efflux, drug inactivation and changes in targets.

The  $\beta$ -lactamases are important determinants of resistance, since these enzymes catalyse the hydrolyse of the  $\beta$ -lactam ring of the antibiotic, inactivating it. The presence of  $\beta$ -lactamases in mobile genetic structures, such as plasmids and integrons of Class 1, has helped spread these determinants.

The aim of this work was to study the prevalence of integrons of Class 1 containing genetic determinants of resistance to antibiotic in *P. aeruginosa*.

*P. aeruginosa* isolates were recovered from 42 patients admitted to the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, during October of 2007 and January of 2008. These isolates were identified and antibiotic susceptibilities were determined by the automatic Vitek®2 Biomerieux®. The detection of integrons, was performed by PCR followed by sequencing.

Class 1 integrons were identified in 14 of the isolates possessing 8 distinct cassettes de gene arrays.

This study demonstrated the presence of the In99 integron, which was identified in previous studies in the same hospital.

The results of the present study suggest the possibility of spreading of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 genes, which were identified in integrons of 4 strains of *P. aeruginosa* and showed the prevalence of the In99, which suggests its spread in the community / hospital.

# Índice

ÍNDICE .....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
INTRODUÇÃO .....	1
1 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	1
2 TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	2
3 ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS.....	3
3.1 MECANISMO DE ACÇÃO .....	3
3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	4
4 QUINOLONAS.....	4
4.1 MECANISMO DE ACÇÃO .....	5
4.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	5
5 AMINOGLICOSÍDEOS .....	6
5.1 MECANISMO DE ACÇÃO .....	6
5.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA .....	7
6 POLIMIXINAS .....	7
6.1 MECANISMO DE ACÇÃO .....	7
6.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	8
7 B-LACTAMASES .....	8
7.1 CLASSIFICAÇÃO DAS B-LACTAMASES .....	8
7.1.1 B-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO – ESBL.....	10
7.1.2 METALO-B-LACTAMASES.....	11
8 INTEGRÕES .....	13
8.1 INTEGRÕES DE CLASSE 1 .....	15
9 GENOTIPAGEM BACTERIANA.....	16
9.1 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA GENÓMICO - RFLP's.....	17
9.2 TÉCNICAS DE TIPAGEM BASEADAS EM PCR .....	18
OBJECTIVOS.....	19



MATERIAL E MÉTODOS .....	21
1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	21
2. CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS .....	21
3. IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS .....	22
• COLORAÇÃO DE GRAM .....	22
• CITOCROMO OXIDASE .....	23
• SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK® 2 .....	24
4. PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE INTEGRÕES DE CLASSE1 .....	26
• REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	26
• SUSPENSÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS PARA PCR .....	26
• REAGENTES .....	26
• INICIADORES .....	27
• CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	28
5. ELECTROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR .....	29
6. DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA .....	30
7. GENOTIPAGEM POR BOX-PCR .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
1. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	33
2. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	34
3. INTEGRÕES .....	38
4. CARACTERIZAÇÃO DOS INTEGRÕES .....	38
• ESTIRPE PA31 .....	39
• ESTIRPE PA35 .....	40
• ESTIRPE PA14 .....	41
• ESTIRPES PA2 E PA37 .....	42

• ESTIRPE PA4 .....	43
• ESTIRPES PA30, PA34 E PA39 .....	44
• ESTIRPES PA6, PA32 E PA38 .....	44
• ESTIRPES PA23 E PA26 .....	47
5 GENOTIPAGEM .....	48
CONCLUSÕES .....	51

## Lista de figuras

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS B-LACTÂMICOS (SOUSA 2006) .....	3
FIGURA 2 - PROPAGAÇÃO DE METALLO-B-LACTAMASES (BEBRONE 2007).....	12
FIGURA 3 - ESTRUTURA GERAL DE UM INTEGRÃO DE CLASSE 1, E PROCESSO DE INTEGRAÇÃO DO CASSETES DE GENE NA ZONA VARIÁVEL (ADAPTADO DE CARATTOLI 2001).....	16
FIGURA 4 - NÍVEL DE RESOLUÇÃO DAS VÁRIAS TÉCNICAS DE TIPAGEM MOLECULAR (ADAPTADO DE (RADEMAKER AND BRUIJN 1997). ....	17
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>P. aeruginosa</i> (N=42), PROVENIENTES DO HIP-EPE AVEIRO. ....	34
FIGURA 6 – PERFIL DE RESISTÊNCIA (%) AOS ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>P. aeruginosa</i> (N=42) COLHIDOS ENTRE SETEMBRO 2007 E JANEIRO 2008, NO HIPAVEIRO. ....	35
FIGURA 7 - PERFIL DE RESISTÊNCIA (%) AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>P. aeruginosa</i> (N=178) ISOLADAS NO HIP, AVEIRO – 2008. ....	36
FIGURA 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO IN97 PRESENTE NA ESTIRPE PA31. ....	40
FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO PRESENTE NA ESTIRPE PA35.....	41
FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO IN2345 PRESENTE NA ESTIRPE PA14. ....	42
FIGURA 11 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO PRESENTE NAS ESTIRPES PA2 E PA37. ....	42
FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO IN103 PRESENTE NA ESTIRPE PA4. ....	44
FIGURA 13 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO PRESENTE NAS ESTIRPES PA30, PA34 E PA39.....	44
FIGURA 14 - DENDROGRAMA RESULTANTE DOS PADRÕES DE BOX-PCR DOS ISOLADOS COM INTEGRÃO IN99 UTILIZANDO O COEFICIENTE DE SIMILARIDADE DE DICE. ....	46
FIGURA 15 -ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO IN99 PRESENTE NAS ESTIRPES PA6, PA32 E PA38. ....	47
FIGURA 16 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES E ESTRUTURAS GENÉTICAS QUE CONSTITUEM O INTEGRÃO IN78 PRESENTE NAS ESTIRPES PA23 E PA26.....	48
FIGURA 17 - DENDROGRAMA RESULTANTE DOS PADRÕES DE BOX-PCR DOS ISOLADOS COM INTEGRÕES UTILIZANDO O COEFICIENTE DE SIMILARIDADE DE DICE. ....	49

## Lista de Tabelas

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE B-LACTAMASES BACTERIANAS.....	10
TABELA 2 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELA CARTA AST-N022.....	24
TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES E VOLUME REAGENTES UTILIZADOS NA REACÇÃO DE PCR.....	26
TABELA 4 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DO GENE INTL1. ....	27
TABELA 5 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DAS ZONAS VARIÁVEIS. ....	28
TABELA 6 - PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO. ....	29
TABELA 7 - PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO BOX-PCR.....	31
TABELA 8 - ISOLADOS POSITIVOS PARA A PRESENÇA DE INTEGRÕES DE CLASSE 1, GENES CASSETE AMPLIFICADOS E RESPECTIVO TAMANHO DO “ARRAY”. ....	39

# Introdução

---

## **1 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo de Gram negativo, com dimensões 0.5 a 0.8 por 1.5 a 3.0µm, não esporulado pertencente à família Pseudomonadaceae. Possui metabolismo respiratório aeróbio, não fermentador, podendo reduzir o nitrato em condições de anaerobiose. A sua temperatura óptima de crescimento é de 37°C conseguindo crescer em ambientes com temperaturas até aos 42°C. É móvel, com flagelo polar e produz pigmentos solúveis, piocianina e pioverdina que conferem às colónias coloração azul fluorescente e amarelo esverdeado, respectivamente (Stehling *et al.* 2008; Todar 2008).

*P. aeruginosa* é praticamente ubiqüitária, podendo ser isolada a partir de muitos habitats (no solo, na água, em alimentos e em associação com animais e plantas) já que as suas exigências nutricionais são simples e a sua versatilidade metabólica é muito elevada (Sá-Correia 2000).

*P. aeruginosa* é um patogénico oportunista importante e responsável por grande número de infecções nosocomiais, sendo a sua patogenicidade conferida por diversos factores de virulência e resistência aos agentes antimicrobianos. Esta é frequentemente responsável por um importante número de infecções hospitalares, particularmente em Unidades de Cuidados Intensivos. Isto é potenciado pelo facto dos doentes, para além do seu estado debilitado, estarem sujeitos a meios de suporte de vida mais agressivos (dispositivos intravasculares, sondas vesicais, dispositivos de assistência respiratória, entre outros) e a uma prolongada permanência no hospital. Por outro lado *P. aeruginosa* é constantemente introduzida no meio

hospitalar pelas pessoas e por alimentos contaminados (Sá-Correia 2000; Paterson 2006; Martins *et al.* 2008).

*P. aeruginosa* possui pili e outras adesinas que são importantes para a aderência e colonização de membranas mucosas e outras superfícies. Esta é produtora de alginato, um polissacarídeo extracelular mucóide, que lhe confere a capacidade de crescimento em biofilme, conferindo protecção contra as defesas do sistema imunitário do hospedeiro e da acção dos agentes antimicrobianos (Stehling *et al.* 2008; Todar 2008). A reduzida susceptibilidade bacteriana aos antibióticos nos biofilmes pode ser devida à fraca penetração do antibiótico, à sua interacção com constituintes do biofilme, ao atingimento da fase estacionária dos microrganismos no biofilme, ao stress adaptativo e à formação de células resistentes (Sousa 2006). A invasão e necrose dos tecidos do hospedeiro são efectuadas por diversos produtos secretados para o meio circundante, incluindo elastases, proteases, citotoxinas, exotoxinas e hemolisinas (Stehling *et al.* 2008; Todar 2008).

*P. aeruginosa* apresenta diversos mecanismos de resistência intrínseca a diversos de antibióticos de uso clínico (maioria das penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, e algumas de 3ª geração, tetraciclina, cloranfenicol entre outros) assim como a capacidade de desenvolver resistências pela aquisição de genes de resistência, por transferência horizontal de genes (transportados em plasmídeos, transposões ou integções) e /ou por acumulação de mutações pontuais que conduzem à alteração do seu material genético (Delgado *et al.* 2007; Murray 2007).

## **2 Tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa***

Actualmente os antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* são: alguns  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos), alguns aminoglicosídeos, polimixina e fluoroquinolonas. A ausência de novos antibióticos eficazes contra *P. aeruginosa* multi-resistentes num futuro próximo, justifica a vigilância e controlo das estirpes de cada hospital (Sá-Correia 2000; Raja and Singh 2007). O conhecimento dos mecanismos de resistência é de significativa importância pela possibilidade que abre de se poder prevenir o seu aparecimento (Carattoli 2001; Murray 2007).

A prescrição de terapêutica empírica bem como a profilaxia, deve basear-se nos perfis de susceptibilidade observados na área geográfica e hospital em causa.

Para tratamento de infecções graves provocadas por *P. aeruginosa*, a mono terapia aumenta as probabilidades de selecção de mutantes resistentes. Nestas situações é recomendada a co-administração de agentes antimicrobianos de forma a obter melhores resultados clínicos. Os aminoglicosídeos são frequentemente utilizados em regime terapêutico combinado com  $\beta$ -lactâmicos ou a administração de uma fluoroquinolona com uma penicilina de espectro alargado (Raja and Singh 2007).

### 3 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem o grupo de agentes antimicrobianos mais variado e mais utilizado no tratamento clínico de infecções causadas por diversas bactérias, tanto em meio hospitalar como em ambatório. Estes fármacos são a opção terapêutica mais frequente dada a sua elevada eficácia antimicrobiana e baixa toxicidade para as células eucariotas.

Esta classe de antibióticos caracteriza-se por apresentar um anel  $\beta$ -lactâmico, estrutura cíclica de quatro átomos (três de carbono e um de azoto), com radicais substituintes. Em função das características estruturais da cadeia lateral os  $\beta$ -lactâmicos são classificados em penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems e inibidores das  $\beta$ -lactamases (Sousa 2006; Suárez and Gudiol 2009). A estrutura química destes compostos encontra-se representada na figura 1

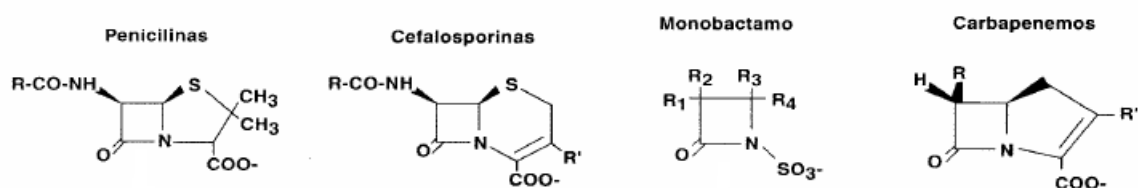


Figura 1 - Estrutura química dos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa 2006)

#### 3.1 Mecanismo de acção

O peptidoglicano é uma macromolécula que reveste a célula bacteriana e que se encontra unicamente em células procariotas. É uma molécula composta de aminoácidos e açúcares, sendo constituída por cadeias lineares paralelas de dois açúcares aminados, N-

acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetil-murâmico (NAMA) dispostos alternadamente e unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ 1-4 (Sousa 2006).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos actuam bloqueando a fase final da síntese do peptidoglicano inibindo as enzimas que participam na sua formação (transpeptidases, carboxipeptidases). Este mecanismo baseia-se na união de  $\beta$ -lactâmicos a receptores específicos localizados na superfície da membrana citoplasmática, denominados “proteínas receptoras de penicilina” (PBPs) evitando a síntese de uma parede celular intacta. Estes antibióticos só são activos contra células bacterianas em crescimento (Sousa 2006; Suárez and Gudíol 2009).

A afinidade do antibiótico para as PBPs deve-se ao facto da estrutura da ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico ser análoga à ligação peptídica da D-alanil-D-alanina. A inibição da PBP-1 provoca a lise celular enquanto que a inibição da PBP-2 leva à formação de esferoplastos. (Sousa 2006).

### 3.2 Mecanismos de Resistência

*P. aeruginosa* é naturalmente resistente, ou pode adquirir resistência, a um grande número de antibióticos, devido a alterações da permeabilidade da membrana externa, mecanismos de efluxo, alteração das PBPs e produção de  $\beta$ -lactamases (Álvares *et al.* 2005).

As  $\beta$ -lactamases são determinantes de resistência importantes, uma vez que estas enzimas hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, inactivando-o, comprometendo as opções de tratamento das infecções causadas por esses agentes. A presença de  $\beta$ -lactamases em estruturas genéticas móveis, como plasmídeos e integrrões da classe 1, tem contribuído para a disseminação de determinantes de resistência entre populações bacterianas da mesma espécie e de espécies diferentes (Mendes *et al.* 2006; Sousa 2006).

## 4 Quinolonas

A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi isolada como subproduto da síntese de cloroquina. Este grupo de antibióticos tornou-se a principal escolha para o tratamento de infecções do trato urinário devido à sua grande eficácia contra bacilos de Gram negativo. A introdução das 4-quinolonas fluoradas (enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin,



lomefloxacin e pefloxacin), representou um avanço terapêutico particularmente importante, visto que estes fármacos têm ampla actividade antimicrobiana e mostram-se eficazes no tratamento de uma grande variedade de doenças infecciosas. As fluoroquinolonas apresentam uma boa biodisponibilidade, um bom perfil farmacocinético e baixa incidência de efeitos secundários (Ball 2000; Emmerson and Jones 2003; Kasper *et al* 2005).

#### 4.1 Mecanismo de acção

A actividade bactericida das quinolonas resulta da inibição das topoisomerasas DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV. Estas enzimas são fundamentais no processo de replicação e transcrição do DNA (ácido desoxirribonucleico) (Sousa 2006).

A enzima DNA girase é constituída por duas sub-unidades A e duas sub-unidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Esta enzima é o principal alvo das quinolonas em bactérias de Gram negativo e é responsável pelo superenrolamento negativo do DNA durante o processo de replicação e transcrição (Ruiz 2003).

A enzima topoisomerase IV é constituída por duas subunidades A e B, codificada pelos genes *parC* e *parE* respectivamente, apresentando grande homologia com as subunidade A e B da DNA girase. Esta enzima é o principal alvo das quinolonas em bactérias de Gram positivo e é responsável pela separação das duas cadeias de DNA que se encontram interligadas, após replicação (Ruiz 2003).

#### 4.2 Mecanismos de Resistência

A resistência a quinolonas aumentou após a introdução das fluoroquinolonas, particularmente em *P. aeruginosa* e estafilococos. A prescrição indiscriminada deste agente antimicrobiano, em meio hospitalar e ambulatório tem sido apontada como uma das principais causa de aquisição de resistências (Kasper *et al.* 2005).

A resistência a quinolonas deve-se principalmente a mutações cromossómicas de genes que codificam DNA girase e/ou topoisomerase IV e por mutações de genes que regulam a expressão de sistemas de efluxo. Contudo estão descritos três mecanismos de resistência a quinolonas mediada por genes plasmídicos (PMQR - plasmid-mediated quinolone resistance): gene *qepA*, que codifica a bomba de efluxo pertencente à Superfamília Facilitadora Principal; uma variante da aminoglicosídeos-acetiltransferase *aac(6')-Ib-cr* que modifica a ciprofloxacina e determinantes *qnr* (Kim *et al.* 2009). Os determinantes genéticos *qnr*, codificam um grupo

de proteínas “pentapeptide repeat family”. Actualmente estão descritos cinco tipos de genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*). A proteína QnrA liga-se tanto à DNA girase como à topoisomerase IV, impedindo a ligação das quinolonas ao seu alvo (Nordmann and Poirel 2005; Minarini *et al.* 2008).

## 5 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos constituem um grupo bastante heterogéneo de antibióticos formados por dois ou mais açúcares aminados unidos por ligações glicosídicas a um núcleo amonociclitol, com actividade bactericida contra um largo espectro de bactérias com significado clínico (Magnet and Blanchard 2004; Caldeira 2009).

Os aminoglicosídeos, quanto à sua origem podem ser naturais (estreptomicina, espectinomicina, neomicina, canamicina, gentamicina, tobramicina) ou semi-sintéticos (amicacina, netilmicina) (Vakulenko and Mobashery 2003; Caldeira 2009).

Apesar da seu potencial de nefrotoxicidade e ototoxicidade, os aminoglicosídeos são úteis no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos outros antibióticos menos tóxicos, nas terapêuticas empíricas, nas infecções graves por bacilos de Gram negativo, nas infecções nosocomiais e em especial nos doentes neutropénicos (Vakulenko and Mobashery 2003).

Os aminoglicosídeos possuem diversas vantagens terapêuticas: estabilidade metabólica, rápida acção bactericida, largo espectro de acção antimicrobiana, sinergismo com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e raros fenómenos de hipersensibilidade (Vakulenko and Mobashery 2003; Sousa 2006).

### 5.1 Mecanismo de acção

Estes actuam através da inibição da síntese proteica, bloqueando irreversivelmente as subunidades do ribossoma bacteriano. Esta ligação induz erros na leitura do código genético bacteriano e inibe a translocação do RNA (ácido ribonucleico), conduzindo, na maioria dos casos, à morte da célula (Vakulenko and Mobashery 2003; Caldeira 2009).

## 5.2 Mecanismo de Resistência

Os mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos incluem a transformação química do antibiótico por enzimas, alteração dos ribossomas por mutação, algumas estirpes bacterianas exibem ribossomas alterados sem afinidade para estes antibióticos, limitação do acesso do antibiótico ao interior da bactéria através da redução da permeabilidade da parede bacteriana e protecção ribossomal por metilação do rRNA 16S (Vakulenko and Mobashery 2003; Magnet and Blanchard 2004).

## 6 Polimixinas

A crescente emergência de estirpes multi-resistentes, principalmente bactérias de Gram negativo, e a ausência de desenvolvimento de novos fármacos activos para estes agentes tem conduzido à necessidade de recuperar “velhos” fármacos como as polimixinas (Zavascki *et al.* 2007).

As polimixinas são um grupo de antibióticos polipeptídicos catiónicos com uma estrutura cíclica (electrostaticamente carregada positivamente), ligados por uma ligação amida a uma cadeia de ácido gordo. Estes antibióticos são produtos da fermentação de *Bacillus polymyxa* e constituem um grupo de antibióticos formado por cinco compostos diferentes cada um designado por uma letra de A a E. Devido à elevada toxicidade, apenas as polimixinas B e E, também designada por colistina, são usadas em último recurso na prática clínica (Gupta *et al.* 2009).

### 6.1 Mecanismo de acção

As polimixinas são activas contra uma grande variedade de bactérias aeróbias de Gram negativo e não apresentam actividade contra bactérias de Gram positivo (Sousa 2006).

A colistina e polimixina B têm a sua actividade antimicrobiana dirigida principalmente contra a membrana da célula bacteriana. Os polipeptídeos catiónicos da colistina e da polimixina B interagem com os lipopolissacarídeos aniónicos da membrana externa das bactérias de Gram negativo, levando à deslocação dos iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Estes acontecimentos provocam a destabilização da membrana celular, aumentando a

sua permeabilidade, conduzindo à excreção de elementos vitais do citoplasma e morte celular (Gupta Sachin, Govil Deepak et al. 2009).

## 6.2 Mecanismos de Resistência

A resistência às polimixinas em bactérias de Gram negativo pode dever-se a fenómenos de adaptação ou mutação, que conduzem a alterações da constituição da membrana externa da bactéria nomeadamente, redução de proteínas específicas da membrana externa, redução do conteúdo de iões de magnésio e cálcio, e alterações lipídicas. (Gupta *et al.* 2009)

## 7 $\beta$ -LACTAMASES

As  $\beta$ -lactamases são enzimas bacterianas com a capacidade de ligação e hidrólise dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, por acilação. Em bactérias de Gram negativo, estas enzimas estão localizadas no espaço periplásmico e inactivam o antibiótico  $\beta$ -lactâmico logo que este atravessa a membrana externa antes de eles atingirem as PBPs (Bush *et al.* 1995).

As  $\beta$ -lactamases hidrolisam os  $\beta$ -lactâmicos formando uma ligação éster entre o seu centro activo de serina e o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico. As metalo- $\beta$ -lactamases, como o seu nome indica, utilizam iões zinco do centro activo para romper o anel  $\beta$ -lactâmico (Livermore 1995; Queenan and Bush 2007).

As  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase – ESBL) englobam um grupo importante de enzimas com a capacidade de hidrolisar  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro (Bradford 2001).

### 7.1 Classificação das $\beta$ -Lactamases

A classificação das  $\beta$ -lactamases torna-se difícil pelo constante aparecimento de novas enzimas e por apresentarem uma grande diversidade de características. A classificação das  $\beta$ -lactamases têm sido baseada em vários critérios: actividade hidrolítica, susceptibilidade a

inibidores, localização genética e sequência de aminoácidos dos genes codificadores (Bush *et al.* 1995).

Em 1980, Ambler propôs um sistema de classificação molecular das  $\beta$ -lactamases constituído por quatro classes diferentes, tendo como base as sequências de aminoácidos daquelas enzimas. As classes moleculares A, C e D compreendem as  $\beta$ -lactamases serínicas, que têm em comum o facto do seu centro activo ser constituído por serina. A classe B engloba as metalo-  $\beta$ -lactamases cujo centro activo contém iões de zinco (Queenan *et al.* 2007).

Na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, as  $\beta$ -lactamases são agrupadas em quatro grupos de acordo com as seguintes critérios:

- classe molecular a que pertencem;
- afinidade para os substratos benzilpenicilina, cefaloridina, carbenicilina, cloxacilina ou oxacilina, cefalosporinas de terceira geração ou aztreonamo e imipenemo;
- inibição pelo ácido clavulânico ou pelo EDTA.

Na tabela 1 está representada a correlação existente entre a classificação proposta por Ambler e a classificação proposta por Bush-Jacoby-Medeiros.

Tabela 1 - classificação de  $\beta$ -lactamases bacterianas.

Classe funcional (Bush-Jacoby-Medeiros)		Classe Molecular (Ambler)	Inibidas por		Enzimas representativas	Substratos preferenciais
Grupo	Subgrupo		AC	EDTA		
1		C	-	-	AmpC, MIR-1	Cefalosporinas
2	2a	A	+	-	Penicilinas de Gram +	Penicilinas
	2b	A	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Penicilinas, Cefalosporinas
	2be	A	+	-	TEM-derivados SHV-derivados CTX-M-1-26	Penicilinas de espectro reduzido e Cefalosporinas de largo espectro
		D	$\pm$	-	PER, GES-1, OXY-1/2 (K1), OXA-11,14,16,17	
	2br	A	$\pm$	-	TEM-30-36, TRC-1, SHV-49	Penicilinas
	2c	A	+	-	PSE-1,3 4, BRO-1-3	Penicilinas, carbenicilina
	2d	D	$\pm$	-	OXA-1-10, PSE-2	Penicilinas, cloxacilina
	2e	A	+	-	CepA,FPM-1, L2	Cefalosporinas
	2f	A	+	-	NMC-A, Sme-1-3,	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenemos
		D	$\pm$	-	Imi-1-3, KPC-1,2, GES-2 OXA-24-26,40, 51,58,72	
3		B	-	+	VIM, IMP, SPM, GIM L1, CcrA	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos
4		ND	-	?	Penicilinas de <i>B. cepacea</i>	Penicilinas

Notas: AC – Ácido Clavulânico; (+) inibida; (-) não inibida; ( $\pm$ ) pouco inibida; ND – não determinado; Adaptado de Bush *et al.* 1995.

### 7.1.1 $\beta$ -lactamases de espectro alargado – ESBL

As  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase – ESBL) caracterizam-se pela sua capacidade de hidrolisar cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, assim

como, às ureidopenicilinas, carboxipenicilinas e ao aztreonamo. A maioria destas enzimas resulta de mutações que ocorrem em  $\beta$ -lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Bradford 2001).

Os genes que codificam para as ESBL's encontram-se descritos principalmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Contudo, estes genes já foram descritos noutras espécies tais como: *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.* e *Pseudomonas spp.* (Bradford 2001).

### 7.1.2 Metallo- $\beta$ -Lactamases

As metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) constituem uma família de enzimas muito heterogénea, e encontram-se agrupadas na classe B de Ambler e no grupo 3 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Toleman *et al.* 2005). Apesar da sua diversidade, estas partilham quatro características principais: a) capacidades de hidrolisar os carbapenemos, b) incapacidade de hidrolisar monobactams, c) são inibidas por quelantes de iões metálicos, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido 2-mercaptopropiónico, d) e requerem iões de zinco ( $Zn^{2+}$ ) como cofactor para a actividade catalítica (Wommer *et al.* 2002; Walsh *et al.* 2003; Toleman *et al.* 2005).

Diversas famílias de MBLs foram identificadas até ao momento. Bioquimicamente as MBLs encontram-se divididas em três subgrupos. O grupo 3a inclui enzimas com espectro alargado de actividade hidrolítica, hidrolisando tanto penicilinas como cefalosporinas, que são hidrolisadas mais lentamente do que o imipenemo. Estas enzimas necessitam de iões  $Zn^{2+}$  para a sua actividade máxima. O subgrupo 3b compreende as enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenemos, sendo consideradas as verdadeiras carbapenemases. Todas as enzimas deste subgrupo necessitam  $Zn^{2+}$  para a sua actividade hidrolítica e são inibidas por EDTA. O subgrupo 3c inclui enzimas que hidrolisam carbapenemos mais lentamente que os outros  $\beta$ -lactâmicos (Wommer *et al.* 2002; Walsh *et al.* 2005; Sousa 2006; Bebrone 2007).

As MBLs são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* e *Aeromonas spp.* Contudo, desde o início da década de 1990, novos genes que codificam MBLs têm sido descritos em microrganismos patogénicos clinicamente importantes, como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e membros da família Enterobacteriaceae (Toleman *et al.* 2005; Mendes *et*

*al.* 2006). A primeira *P. aeruginosa* produtora de MBLs foi descrita em 1991 no Japão, desde então tem vindo a ser descrita em diversas regiões do Mundo como a Ásia, Europa, Austrália, América do Sul e América do Norte (Pitout *et al.* 2007).

Actualmente são conhecidas seis subclasses de MBLs adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo Metallo- $\beta$ -lactamase), GIM (German imipenemase) e mais recentemente foram detectadas duas novas enzimas designadas por SIM (Seoul imipenemase) e DIM-1 (Dutch IMipenemase) (Lee *et al.* 2005; Toleman *et al.* 2005; Poirel *et al.* 2009).

As MBLs IMP e VIM apresentam ampla distribuição geográfica, como mostra a figura 2, sendo mais frequentes no Sudeste Asiático e Europa, respectivamente (Toleman *et al.* 2005).

Os genes que codificam as MBLs podem-se encontrar inseridos em cassetes de gene localizadas no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos. Adicionalmente, podem associar-se a integrrões, normalmente integrrões de classe 1, ou a transposões aumentando o seu potencial de disseminação (Toleman *et al.* 2003; Toleman *et al.* 2005; Mendes *et al.* 2006).

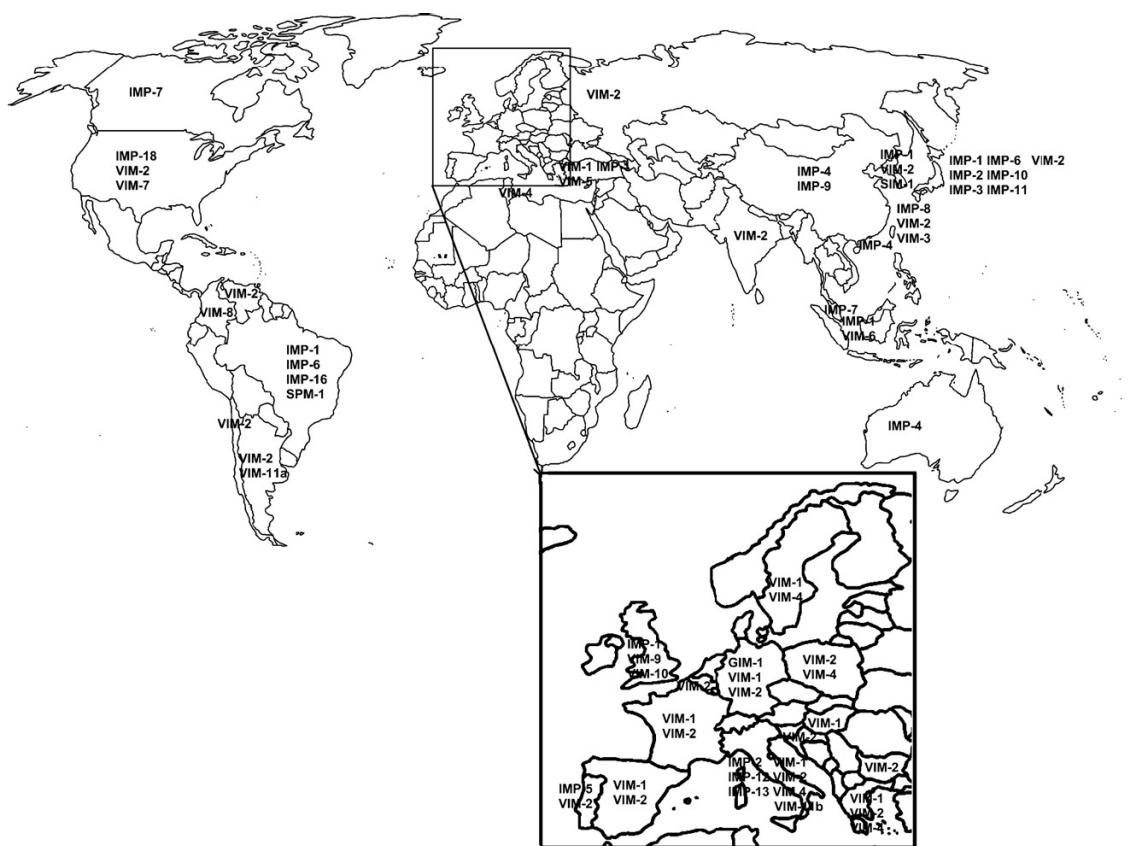


Figura 2 - Propagação de metallo- $\beta$ -lactamases (Bebrone 2007).



## 8 Integções

Os integrões são elementos genéticos que contêm determinantes de recombinação sítio-específica, que têm a capacidade de reconhecimento, captura e expressão de genes ou grupo de genes móveis não funcionais, designados por cassetes de gene, convertendo-os em genes funcionais (Mazel *et al.* 1998; Barlow *et al.* 2004). Descritos em 1980, por Stokes e Hall, os integrões podem ser encontrados em cromossomas ou em estruturas móveis, plasmídeos e transposões, contribuindo para disseminação de genes de resistência a antibióticos (Martinez-Freijo *et al.* 1999; Barlow *et al.* 2004).

Os integrões apresentam uma estrutura base comum, constituída por três zonas distintas: um segmento conservado 5' (5'CS), um segmento conservado 3' (3'CS) separados por uma zona variável (RV) onde se inserem os cassetes de gene. Os integrões não incluem necessariamente cassetes de gene, mas uma vez integradas passam a fazer parte do integrão (Paulsen *et al.* 1993).

O segmento 5'CS é formado por dois elementos, o gene *IntI* e o local *attI*, que permitem a mobilização e a inserção de cassetes de gene. O gene *IntI* é transcrito através do seu próprio promotor designado por *Pint* e codifica uma proteína, pertencente à família das recombinases de tirosina denominada por integrase (Collis and Hall 1992).

O local activo de recombinação primário *attI* funciona como receptor de cassetes de gene e encontra-se na cadeia complementar à que codifica a proteína *IntI* numa posição adjacente ao gene *intI*. A sua sequência nucleotídica não constitui um gene e pode variar entre os 40 e os 70 pares de bases. A integrase *IntI* é responsável pela mobilidade dos cassetes de gene, possui a capacidade de excisar ou integrar cassetes de gene através de recombinação sítio-específica entre o local *attI* do integrão e o local *attC* do cassetes de gene ou entre dois locais *attC* (Collis and Hall 1995; Carattoli 2001).

Os cassetes de gene são elementos móveis não replicativos e incluem um gene que pode codificar resistência aos antibióticos e um local de recombinação específico da integrase, designada por elemento de 59 bases (59-be) ou *attC* (Bennett 1999).

Estes genes podem possuir entre 263 pb a 1549 pb e podem existir tanto em forma livre circular ou podem estar sob forma linear integradas no local *attI* fazendo parte de um integrão (Recchia and Hall 1995; Bennett 1999).

Os locais *attC* possuem muitas variações a nível de tamanho e sequência nucleotídica. No entanto, todos são delimitados por duas sequências nucleotídicas mais ou menos

conservadas denominadas por “inverse core site” (extremidade esquerda) e por “core site” (extremidade direita). O local de recombinação que irá interagir com o local attI e com a IntI localiza-se na extremidade direita (Mazel *et al.* 1998; Carattoli 2001; Dubois *et al.* 2009).

Os cassetes de gene não possuem um promotor na sua estrutura genética, pelo que a sua expressão está dependente do promotor presente no integrão, no qual estão inseridos (Collis and Hall 1995; Bennett 1999; Mendes *et al.* 2006).

A expressão dos cassetes de gene inseridos na zona variável do integrão não é uniforme. Na região a montante do gene *intI* encontra-se uma região promotora formada por um promotor designado por Pc ou Pant, responsável pela expressão dos cassetes de gene inseridos na zona variável do integrão. Alguns integrões podem apresentar um segundo promotor P2 contribuindo para o aumento da expressão dos cassetes de gene (Martinez-Freijo *et al.* 1998; Fluit and Schmitz 2004; Mendes *et al.* 2006).

São conhecidas três versões do promotor Pant, (promotor forte, promotor fraco e promotor híbrido) que possuem diferentes sequências consenso compreendidas entre as regiões -35 e -10. A variante forte deste promotor é seis vezes mais eficiente do que as versões mais fracas (Levesque *et al.* 1995; Recchia and Hall 1995; Martinez-Freijo *et al.* 1998).

A eficiência da transcrição de um cassete de gene também depende da posição onde este se encontra inserido. A transcrição é mais eficiente quando o cassete de gene se encontra mais próximo da região promotora (Bennett 1999; Mendes *et al.* 2006).

O segmento 3'CS, localiza-se no segmento 3' do integrão e tem um tamanho aproximado de 2.0Kb. Este segmento é constituído pelo gene *qacEΔ1*, que confere resistência a brometo de etídio e compostos quaternários de amónio e o gene *sul1* que confere resistência às sulfonamidas (Collis and Hall 1992).

Com base na sequência nucleotídica da enzima integrase, podemos agrupar os integrões em dez classes diferentes, estando apenas cinco associadas a genes de resistência a antibióticos (Correia *et al.* 2003).

Em todas as classes a estrutura geral do integrão é mantida, ocorrendo algumas diferenças não muito significativas, principalmente a nível do 3'CS.

Os integrões podem ser classificados em integrões de resistência (IR) ou em super-integrões (SI). Os integrões de resistência apresentam genes cassette que codificam resistência a antibióticos e podem ser encontrados tanto em plasmídeos como em cromossomas

bacterianos. Os super-integrões, normalmente cromossomais, são constituídos por genes que codificam diferentes funções (Carattoli 2001; Fluit and Schmitz 2004).

## 8.1 Integrões de Classe 1

Os integrões de classe 1 são os mais comuns entre os isolados bacterianos clínicos. Podem ser encontrados em plasmídeos conjugativos ou no cromossoma bacteriano, associados a transposões e sequências de inserção, o que facilita a sua disseminação (Brown *et al.* 1996; Bennett 1999).

Esta classe de integrões foi encontrada em diferentes géneros de bactérias de Gram negativo, incluindo *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Vibrio*. Foram também encontrados em outras bactérias como *Corynebacterium glutamicum* e em *Mycobacterium fortuitum* (Fluit and Schmitz 2004).

Os integrões de classe 1 possuem a estrutura geral anteriormente descrita, possuindo um segmento conservado 5' (5'CS) e um segmento conservado 3' (3'CS) separados pela zona variável (RV). O 5'CS possui o gene *intl1*, que codifica a proteína Int1, e o local attI. O extremo 3'CS possui o gene *qacEΔ1*, que confere resistência a brometo de etídio e compostos quaternários de amónio o gene *sul1* que confere resistência às sulfonamidas e uma ORF5 de função desconhecida (Carattoli 2001).

Na figura 3 está representada a estrutura geral de um integrão de classe 1, e processo de integração do cassetes de gene na zona variável.

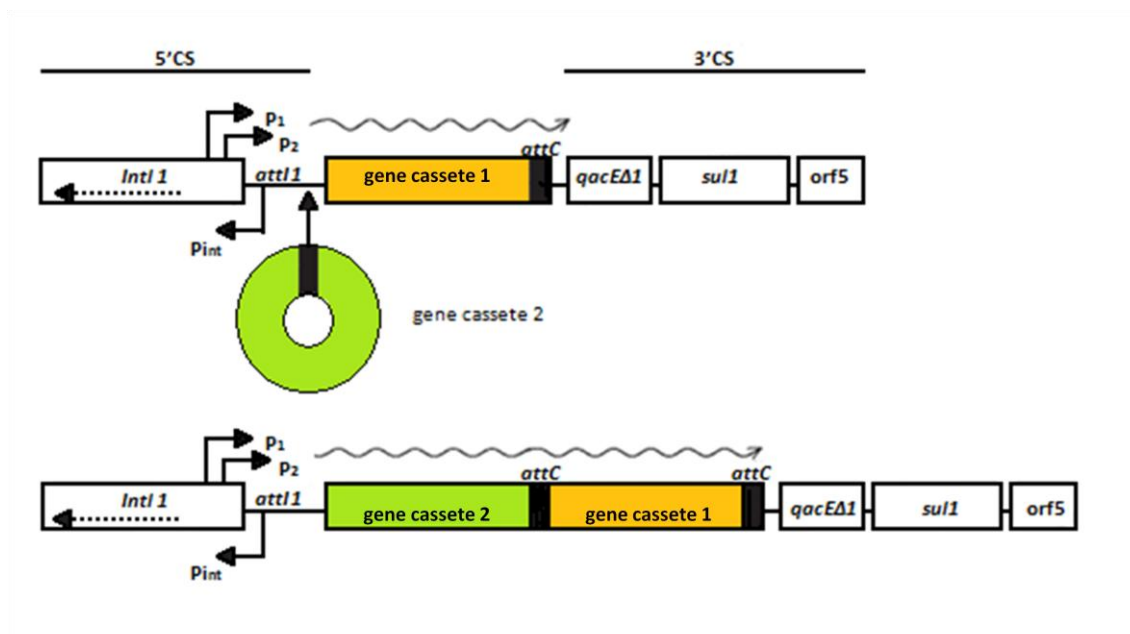


Figura 3 - Estrutura geral de um integrão de classe 1, e processo de integração do cassetes de gene na zona variável (adaptado de Carattoli 2001)

## 9 Genotipagem bacteriana

A tipagem genética é uma metodologia importante em Microbiologia Clínica, que permite caracterizar a diversidade dos microrganismos, permitindo esclarecer a disseminação de uma estirpe causadora de um surto infeccioso (Singh *et al.* 2006).

Os primeiros métodos utilizados na tipagem bacteriana baseavam-se na comparação das características fenotípicas (bioquímicas, fisiológicas e biológicas) dos isolados bacterianos. Estes métodos possuem baixo poder discriminatório e baixa reprodutibilidade quando comparados com métodos genotípicos (Foxman *et al.* 2005).

Actualmente, as técnicas de análise de fragmentos de DNA ou Genotipagem permitem a identificação de organismos com base nas diferenças das suas sequências genómicas permitindo classificá-los até um nível de estirpe, como mostra a figura 4.

Os métodos de genotípicos detectam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, ou variação alélica ao nível de enzimas (Alves *et al.* 2003).

A tipagem molecular, baseada na análise de ácidos nucleicos pode ser dividida em: análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico e técnicas de tipagem baseadas em PCR (Olive and Bean 1999; Singh *et al.* 2006).

Família	Género	Espécie	Subespécie	Estirpe
Sequenciação de DNA				
Sequenciação 16sDNA				
ARDRA				
RFLP PFGE				
AFLP				
RAPD AP-PCR				
rep-PCR				

Figura 4 - Nível de resolução das várias técnicas de tipagem molecular (adaptado de (Rademaker and Bruijn 1997)).

### 9.1 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico - RFLP's

A técnica de tipagem RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), consiste na digestão do DNA total com enzimas de restrição, resultando numa série de fragmentos de diferentes tamanhos que formam diferentes padrões quando separados num gel de agarose. (Singh *et al.* 2006).

A técnica de electroforese em campo pulsado (PFGE) difere da electroforese convencional uma vez que a direcção do campo eléctrico, no qual o DNA está a ser separado vai alternando periodicamente, permitindo a separação de fragmentos de DNA com tamanho superior a 1000 Kb. O padrão obtido depende não só da espécie que estamos a estudar como da endonuclease de restrição utilizada (Singh *et al.* 2006).

## 9.2 Técnicas de Tipagem baseadas em PCR

A técnica de rep-PCR faz uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas presentes no genoma de bactérias (Singh *et al.* 2006).

Estão descritas três famílias de sequências repetitivas altamente conservadas: REP, ERIC e BOX (Lupski and Weinstock 1992; Rademaker and Bruijn 1997):

REP – PCR: (Repetitive Extragenic Palindromic) Estes elementos são constituídos por um palíndromo de aproximadamente 38 pb.

ERIC – PCR: (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) Estes elementos contêm aproximadamente 126 pb, apresentando repetições centrais altamente conservadas e invertidas (Olive and Bean 1999).

BOX – PCR: Os elementos BOX foram descritos pela primeira vez em *S. pneumoniae*, por Claverys e seus colaboradores (1992). Estes elementos apresentam aproximadamente 154 pb, constituídos por três subunidades, na direcção de 5' para 3': boxA, boxB e box C. Estas três subunidades têm comprimentos moleculares de 59, 45 e 50 pb respectivamente (Martin *et al.* 1992).

# Objectivos

---

A resistência aos antibióticos constitui um problema sério no tratamento das doenças infecciosas. O uso indiscriminado de antibióticos no tratamento das doenças infecciosas, quer na comunidade quer no meio hospitalar, tem permitido a selecção de bactérias detentoras de vários mecanismos de resistência aos antibióticos.

A importância de estudar a presença de integroes em isolados clínicos prende-se com o facto de estas estruturas genéticas desempenharem um papel importante na disseminação de genes que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos.

Assim, constituem os principais objectivos deste estudo:

1. pesquisar a presença de integroes de classe 1, caracterizar a respectiva região variável, identificando os diferentes cassetes de gene ;
2. tipagem molecular dos isolados com recurso a BOX-PCR;
3. verificar a prevalência do integrão In99 descrito em estudos anteriores realizados no HIP Aveiro.

# Material e métodos

---

## **1. Origem dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa***

No presente estudo foi analisada uma colecção de 42 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, recolhidos no Hospital Infante D. Pedro E.P.E. entre Outubro de 2007 e Janeiro de 2008. Para o estudo foram seleccionados isolados que apresentassem resistência a uma ou mais classes de antibióticos.

Colheitas do mesmo doente mas com o mínimo de sete dias de intervalo foram consideradas com sendo um isolado diferente.

Os isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram seleccionados após identificação e elaboração do respectivo teste de susceptibilidade a antibióticos. Estes foram isolados a partir de diversos produtos biológicos tais como: pús, expectoração, urina, sangue, aspirado brônquico e pontas de catéter.

## **2. Conservação dos isolados clínicos**

Durante a execução deste trabalho os isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram mantidos em meio de Tripticase de Soja – TSA (Oxoid), a 4°C, e repicados para meio fresco sempre que necessário.

Para a sua conservação a longo prazo foi efectuada uma suspensão de células em caldo de Tripticase de Soja à qual foi adicionado glicerol para uma concentração final de 40%. Esta suspensão foi armazenada a -80°C.



### **3. Identificação e determinação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados clínicos**

No laboratório de Patologia Clínica do Hospital Infante D. Pedro E.P.E. efectuou-se, a partir de colónias puras, a identificação e a determinação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

- **Coloração de Gram**

Com o propósito de estudar as propriedades e/ou de diferenciar os microrganismos em grupos específicos para fins taxonómicos e de diagnóstico, recorre-se normalmente a técnicas de coloração.

Numa primeira fase o exame microscópico de preparações coradas pela técnica de Gram permite classificar os microrganismos com base na sua afinidade para os corantes, tamanho, forma e arranjo celular.

A coloração de Gram, desenvolvida em 1883 pelo médico dinamarquês Christian Gram, é um dos métodos de coloração diferencial que permite dividir as bactérias de acordo com a composição das suas paredes celulares. As bactérias de Gram Positivo tem uma parede celular rica em peptidoglicano, retêm o corante cristal violeta durante um tratamento com etanol-acetona, enquanto as complexas paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem (Prescott 1999; Sá-Correia 2005).

---

**Coloração de Gram**

- Cobrir o esfregaço já fixado, com solução de violeta de cristal durante 1 minuto.
- Lavar com água corrente.
- Cobrir o esfregaço com solução mordente de Lugol e deixar actuar durante 1 minuto.
- Descorar com solução de álcool acetona.
- Lavar com água corrente.
- Cobrir o esfregaço com solução de fucsina diluída durante 1 minuto.
- Lavar com água corrente e secar.
- Observar ao microscópio óptico com objectiva de imersão de 100x

As bactérias de Gram positivo coram de roxo e as de Gram negativo de vermelho.

---

- **Citocromo Oxidase**

As citocromo-oxidases são hemoproteínas que actuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo electrões (hidrogénio) para o oxigénio, com a formação de água. Na prova de citocromo oxidase é utilizado um corante que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio levando ao aparecimento de cor em caso de positividade(Fonceca *et al.* 2004).

---

**Reagentes**

tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato 1% (reagente de Kovac)

**Procedimento**

- Numa tira de papel de filtro colocar algumas gotas de reagente.
- Com uma ansa (não metálica) retirar uma colónia a testar e colocar sobre o papel.

**Interpretação**

- As colónias com bactérias que contenham a actividade da enzima desenvolvem uma cor azul/roxo escura em mais ou menos 10 segundos.
-

## • Sistema Automatizado Vitek®2

O Vitek®2 da Biomerieux® é um sistema automatizado que permite a rápida identificação da estirpe bacteriana e o seu respectivo antibiograma. O sistema de identificação baseia-se em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos que medem a utilização da fonte de carbono, actividade enzimática e resistência.

O teste de sensibilidade a antibióticos do sistema automático Vitek®2 da Biomerieux® resume-se à automatização da técnica da CMI descrita por MacLowry e Marsh e Gerlach. As cartas AST Vitek®2 são essencialmente uma versão miniaturizada e abreviada da técnica de dupla diluição para as Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), determinadas pelo método de microdiluição.

Este equipamento recorre a uma sofisticada análise de dados através de algoritmos, que correlacionam parâmetros analisados em diferentes condições de crescimento e um software exclusivo, o Advanced EXPERT System®, desenvolvido com base em publicações científicas recentes.

A carta específica de identificação de bacilos de Gram negativo é a GN. No caso *P. aeruginosa* a carta para o teste de sensibilidade a antibióticos indicada é a AST-N022, que contém os seguintes antibióticos, tal como indicado na Tabela 2:

Tabela 2 – antibióticos testados pela carta AST-N022.

ESBL	Cefpirome	Netilmicina
Ticarcilina	Aztreonamo	Tobramicina
Ticarcilina/Ác. Clavulânico	Imipenemo	Ciprofloxacina
Piperacilina	Meropenemo	Pefloxacina
Piperacilina/Tazobactan	Amicacina	Cotrimoxazol
Ceftazidima	Gentamicina	Colistina
Cefepima	Isepamicina	

---

**Materiais**

- carta Vitek®2GN
- carta Vitek®2AST-N022
- Dispositivo DENSICHEK Vitek®2
- cassete Vitek®2
- solução salina estéril (NaCl aquoso de 0.45% a 0.50%, pH 4.5 a 7.0)
- tubos de ensaio descartáveis de plástico transparente (poliestireno) de 12mm x 75mm
- ansas ou zaragatoas estéreis
- pipetas

**Procedimento**

- 1 - Dispensar assepticamente 3.0mL de solução salina num tubo específico para esta metodologia.
- 2 - Preparar uma suspensão de bacteriana homogénea, colónias puras e frescas, com uma densidade equivalente a um padrão McFarland entre 0.50 a 0.63.
- 4 – Seleccionar a carta de identificação pretendida e colocar o tubo e respectiva carta na cassete do equipamento.
- 5 – Dispensar 3mL de solução salina estéril num novo tubo e inocular 280µL da suspensão bacteriana anterior.
- 5 – Seleccionar a carta de teste de sensibilidade Vitek® AST-N022 e colocá-la com o respectivo tubo na cassete do equipamento.

As cartas são em seguida colocadas no equipamento Vitek® Compact onde são cheias, seladas e colocadas no leitor/incubadora. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido.

---

## 4. Pesquisa e caracterização genética de integções de classe1

### • Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma metodologia que se baseia na amplificação exponencial selectiva a partir de uma quantidade reduzida de DNA molde.

Neste estudo, a PCR foi utilizada para pesquisa e caracterização de integções de classe 1 nas estirpes de *P. aeruginosa*.

### • Suspensão de células bacterianas para PCR

O DNA bacteriano foi obtido a partir de culturas frescas (18 a 24 horas de incubação) em meio sólido, retirando 3-4 colónias com uma ansa estéril e suspendendo-as em 200µL de água estéril.

### • Reagentes

Os reagentes utilizados na PCR foram adquiridos à firma Promega. As concentrações e quantidades utilizadas encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações e volume reagentes utilizados na reacção de PCR.

Reagentes	Concentração final	Volume
25mM mgCl <sub>2</sub>	3,0 mM	6 µL
5x Tampão	1x	10 µL
10x DIG-dNTP mix	10x	5 µL
Iniciador-Fw	0,3 pmol	1,5 µL
Iniciador-Rw	0,3 pmol	1,5 µL
DNA total	0,5 McFarland	1 µL
Taq (5U µL-1)	1,25U	0,25 µL
dH <sub>2</sub> O	-	Perfazer um volume final de 50,0 µL

## • Iniciadores

Para a pesquisa do gene da Integrase 1 por PCR foi utilizado um par de iniciadores específicos descritos por Barlow e colaboradores (2004)(Tabela 4).

Tabela 4 - Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados na pesquisa do gene *intl1*.

Iniciador	Sequência Nucleotídica	Gene amplificado	Temperatura annealing	Referência
HS 463a	5'-CTGGATTTCGATCACGGCACG-3'	<i>Intl1</i>	59,9°C	Barlow <i>et al.</i> , 2004
HS 464	5'-ACATGCGTGTAATCATCGTCG-3'	<i>Intl1</i>	55,0°C	Barlow <i>et al.</i> , 2004

Nas estirpes onde se obteve amplificação do gene da integrase efectuou-se a amplificação da respectiva zona variável recorrendo a diversos iniciadores descritos na tabela 5. Os iniciadores foram adquiridos à empresa STAB Vida.

Tabela 5 - Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados na caracterização das zonas variáveis.

Iniciador	Sequência Nucleotídica	Gene amplificado	Temperatura annealing	Referência
RB 317	5'-GAACCTTGACCGAACGCAG-3'	ZV	53	Barlow <i>et al.</i> , 2004
RB 320	5'-AGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG-3'	ZV	51,4	Barlow <i>et al.</i> , 2004
i19 F	5'-GGTCCAGCCGTGTACATGGTTC-3'	<i>aacA4</i>	57,9	Caetano <i>et al.</i> 2007
i19 R	5'-GCGTCTCGCTCTCGCCAGG-3'	<i>aadA2</i>	60,6	Caetano <i>et al.</i> 2007
VIM-2 F	5'-TTTGATGGCGCAGTCTACCC-3'	<i>bla<sub>VIM-2</sub></i>	55,0	Este Estudo
<i>aacA4</i> F	5'-TGCGATGCTCAGTGGC-3'	<i>aacA4</i>	51	Este Estudo
<i>aacA4</i> R	5'-GCGATGCTCTATGAGTGGCT-3'	<i>aacA4</i>	52	Este Estudo
<i>aacA7</i> F	5'-GGAGGTTGCTCAAGTACGCT-3'	<i>aacA7</i>	52	Este estudo
<i>aacA8</i> F	5'-CGTACGTTGCACTCGGAAGC-3'	<i>aacA8</i>	56,0	Este estudo
ORF R	5'-CTGGCCCTTGTGTAGCAAGC-3'	<i>OrfD</i>	55	Este Estudo

### • Condições de amplificação do DNA

Para todas as reacções de amplificação do DNA, foram mantidas as mesmas condições, à excepção da temperatura de hibridação, sendo esta específica para cada iniciador.

Os programas adoptados para a amplificação dos vários determinantes genéticos encontram-se descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Programas de amplificação.

Iniciador	DESNATURAÇÃO INICIAL	DESNATURAÇÃO	HIBRIDAÇÃO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL
HS 463a	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C
HS 464	4'	30''	30''	45''	5'
30 Ciclos					
RB 317	94°C	94°C	59°C	72°C	72°C
RB 320	4'	30''	30''	3'30''	10'
30 Ciclos					
a)	94°C	94°C	b)°C	72°C	72°C
	4'	30''	30''	45''	5'
	30 Ciclos				

Nota a) para a caracterização das regiões variáveis dos integrões foram utilizadas diversas combinações de iniciadores descritos na tabela X consoante os resultados da sequência nucleotídica obtida;

b) temperatura de hibridação corresponde à média das temperatura annealing dos dois iniciadores utilizados.

## 5. Electroforese dos produtos amplificados por PCR

Os produtos das reacções de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (Biorad®) a 0,8% ao qual se adicionou brometo de étidio a uma concentração final de 10mg/mL. A electroforese decorreu a 100V durante uma hora em tampão TAE 1x.

A cada amostra foi adicionado, 1/6 do volume de tampão de carga ("Loading Dye" 6x, Fermentas) imediatamente antes da sua aplicação no gel de agarose.

Em todos os géis foi colocado um marcador de peso molecular de DNA adequado ao tamanho do fragmento esperado (DNA ladder mix, Fermentas).



## 6. Determinação da sequência nucleotídica

Os produtos amplificados por PCR destinados à determinação da sequência nucleotídica foram purificados com o kit MiniElute PCR Purification (QIAGEN, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante, obtendo-se no final o amplicão purificado em 20µL de água destilada estéril.

A determinação da sequência nucleotídica dos amplicões foi efectuada pela empresa Stab Vida, o electroforetograma resultante foi analisado com o programa informático Bioedit 7.0.5.3, e a comparação da sequência nucleotídica com outras depositadas nas bases de dados foi efectuada com o software BLAST.

## 7. Genotipagem por BOX-PCR

Neste trabalho, a caracterização genética dos isolados em estudo, foi feita por BOX-PCR.

Nesta reacção foi utilizado o iniciador BOXA1R descrito por Rademaker e Bruijn (1997) com a seguinte sequência: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. O programa de amplificação decorreu conforme apresentado na tabela 7.

Os produtos das reacções de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Biorad®). O gel foi preparado com concentração de 1,5% em tampão TAE e brometo de etídio (0.5µg/mL).

A electroforese decorreu a 80V durante 3 horas, em tampão TBE. Os perfis de DNA obtidos foram visualizados num transluminador de luz ultravioleta e fotografados.

O perfil genético obtido foi analisado com recurso ao software GelCompar II

Tabela 7 - Programa de amplificação BOX-PCR

DESNATURAÇÃO INICIAL	DESNATURAÇÃO	HIBRIDAÇÃO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL
95°C	94°C	69,6°C	65°C	65°C
7 Minutos	1 Minuto	1 Minuto	8 Minutos	16 Minutos
	35 Ciclos			

# Resultados e Discussão

---

## **1. Origem dos isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

Durante o período Outubro de 2007 e Janeiro de 2008 foram recolhidos 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa* do Hospital infante D. Pedro E.P.E. Aveiro.

Dos 42 isolados 73.8% (n=31) eram provenientes de doentes hospitalizados e 26.2% (n=11) de doentes provenientes do serviço de urgência. As amostras foram isoladas a partir de expectoração (37%), pús (27%), urina (24%), sangue (7%) aspirados (3%) e pontas de catéter (3%) como mostra a figura 5.

Os isolados colhidos pertenciam maioritariamente a indivíduos do sexo masculino (69%). Das amostras estudadas 83.3% pertenciam a indivíduos com idades superiores a 60 anos.

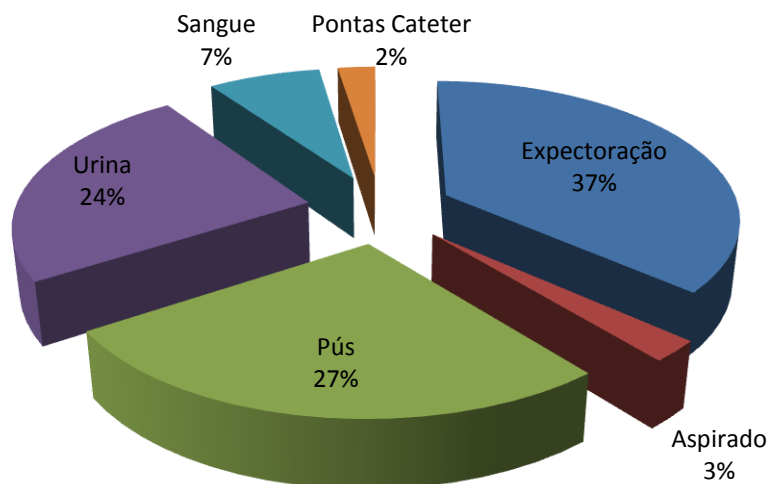


Figura 5 - Distribuição percentual dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n=42), provenientes do HIP-EPE Aveiro.

A pneumonia nosocomial é uma causa frequente de morbidade e mortalidade em doentes hospitalizados, em especial naqueles que estão internados em Unidades de Cuidados intensivos.

Os bacilos de Gram negativo são actualmente a principal causa de bacteriemia e de pneumonia nosocomial. A pneumonia por *P. aeruginosa* ocorre com mais frequência em pacientes neutropénicos, com fibrose quística e naqueles que recebem antibioterapia de largo espectro. Pode ser adquirida por aspiração da flora orofaríngea ou, secundariamente, por inalação de reservatórios nebulizadores (Nogueira 1998).

O presente estudo mostrou, como seria de esperar, que a principal origem de isolados foi de amostras das vias respiratórias, com 40% (n=16) das amostras (37% de expectorações e 3% de aspirados brônquicos).

## 2. Perfis de Susceptibilidade aos Agentes Antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos dos 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram executados no sistema automatizado Vitek®2 da Biomerieux® (Figura 6). O antibiótico ao qual *P. aeruginosa* apresentou maior percentagem de resistência foi o cefpirome (83.3%) e o que apresentou menor percentagem de resistência foi a ampicilina (14.3%).

*P. aeruginosa* é um dos principais agentes patogénicos responsáveis por infecções hospitalares, sendo notória a sua capacidade de desenvolver resistência a antibióticos de primeira linha. Neste contexto, torna-se importante a avaliação periódica das susceptibilidades dos principais agentes causais e a sua difusão em cada área geográfica, de forma a auxiliar no início de um tratamento empírico adequado bem como a profilaxia (Cavallo *et al.* 2007; Martins *et al.* 2008).

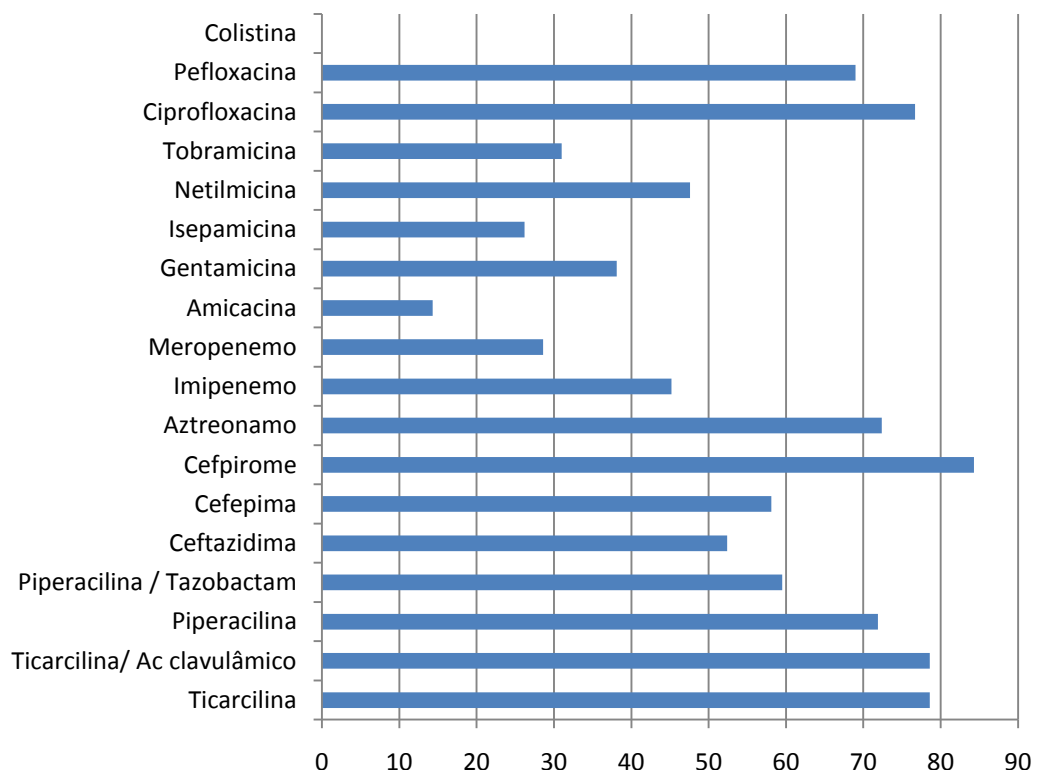


Figura 6 – perfil de resistência (%) aos antimicrobianos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n=42) colhidos entre Setembro 2007 e Janeiro 2008, no HIPAveiro.

No presente estudo verificou-se que os aminoglicosídeos foram a classe de antibióticos com maior actividade, apenas 14.3% dos isolados apresentaram resistência para a amicacina e 26.2% para isepamicina.

Relativamente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, os carbapenemos foram os que apresentaram melhor actividade (imipenemo 54.8% e meropenemo 71.4%). A percentagem de susceptibilidade superior para o meropenemo relativamente ao imipenemo poderá ser

explicada pelo facto de ser necessário a diminuição da expressão da porina OprD e aumento da expressão da bomba de efluxo MexAB-OprM para aquisição de resistência ao meropenemo, enquanto que no caso do imipenemo a diminuição da expressão da porina OprD é suficiente para aquisição de resistência (Livermore 2001).

Das penicilinas estudadas, a piperacilina foi a que apresentou melhor actividade (38.1%) apresentando mais 2.4% de eficácia quando associada ao tazobactam. Das cefalosporinas estudadas a ceftazidima foi a que apresentou melhor actividade (47.6%) seguida da cefepima (42.9%) e pela ceftioxi (16.7%). O monobactâmico aztreonam apresentou uma percentagem de susceptibilidade de 28.6%.

No presente estudo nenhuma estirpe apresentou resistência para o antibiótico colistina, contudo dado o facto de este apresentar uma elevada toxicidade, limita a sua utilização sistémica.

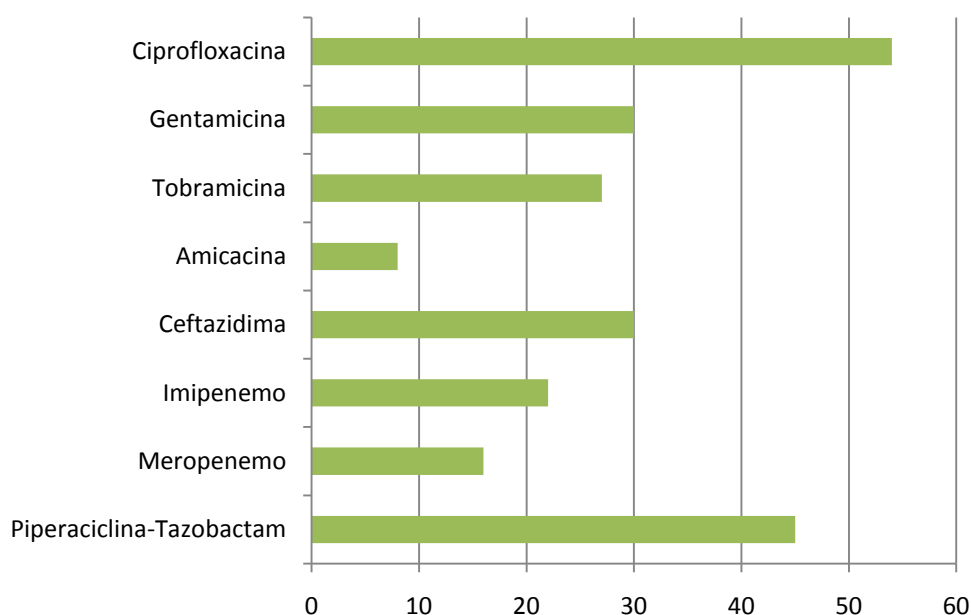


Figura 7 - Perfil de resistência (%) aos antimicrobianos de isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n=178) isoladas no HIP, Aveiro – 2008.

No relatório anual de susceptibilidade aos antimicrobianos de 2008 do serviço de Microbiologia do HIP, Aveiro, verificou-se que a amicacina foi o antibiótico com maior actividade (92%) para *P.aeruginosa*, seguido dos carbapenemos, meropenemo (84%) e imipenemo (78%) (Figura 7).

Dos resultados obtidos no presente estudo e no relatório anual de 2008 do serviço de microbiologia do HIP, é de salientar a elevada percentagem de resistência das estirpes de *P. aeruginosa* para a piperacilina/tazobactam e ciprofloxacina.

No estudo realizado no Hospital Geral de Santo António, EPE, num período de 3 anos (2004-2006), mostrou que o imipenemo (37,7%) foi o antibiótico ao qual *P. aeruginosa* apresentou maior percentagem de resistência e a amicacina (14,5%) o que apresentou menor percentagem de resistência (Martins *et al.* 2008).

No estudo realizado Centro Hospitalar de Coimbra, entre 2003 e 2006, mostrou que 85,1% dos isolados hospitalares de *P. aeruginosa* eram sensíveis à piperacilina com o tazobactam, 84,8% ao meropenemo, 81,5% à piperacilina, 79,4% à ceftazidima, 75% ao aztreonamo e 74,7% ao imipenemo. A amicacina mostrou uma boa actividade (81.3%) mas a gentamicina apresentou uma actividade mais reduzida (58.1%). Este estudo mostrou que 9.1% dos isolados eram multi-resistentes (isolados que apresentavam resistência a três ou quatro dos seguintes antibióticos: piperacilina, ceftazidima, imipenemo e ciprofloxacina, foram considerados multi-resistentes) (Cardoso *et al.* 2007).

Considerando o critério supracitado, os resultados obtidos no presente estudo mostram que 42.9% (n=18) de isolados eram multi-resistentes, tendo-se verificado que dois isolados mostraram ser sensíveis apenas para a colistina. A percentagem de multiresistência elevada verificada pode dever-se aos critérios de amostragem e à dimensão da amostra.

A disseminação de bactérias multirresistentes poderá ser facilitada, principalmente nos hospitais devido a vários factores tais como as más práticas dos profissionais de saúde, como a deficiente higiene das mãos, número de doentes por enfermaria, e pela transferência de doentes entre hospitais com a importação de estirpes multi-resistentes (Hanberger *et al.* 1999; Sá-Correia 2000; Aloush *et al.* 2006).

No presente estudo as fluoroquinolonas ciprofloxacina e pefloxacina apresentaram actividade em 33.3% e 31.0% dos isolados, respectivamente.

Um estudo realizado pela European Surveillance of Antimicrobial Consumption mostrou que Portugal (juntamente com Espanha e Itália) é o país europeu com maior consumo de fluoroquinolonas (Ferech *et al.* 2006; Cardoso *et al.* 2007). O uso abusivo destes antibióticos poderá explicar a baixa susceptibilidade demonstrada pelos isolados analisados quer no presente estudo quer no relatório anual do ano de 2008 do serviço de Microbiologia do HIP. Um outro estudo realizado em Espanha, sobre a evolução das resistências a antimicrobianos em *P. aeruginosa*, comparando os resultados de um estudo de 1998 com outro de 2003,

verificou o aumento de resistências aos carbapenemos e às fluoroquinolonas (Sánchez-Romero *et al.* 2007).

A amicacina tem sido utilizada como antibiótico de reserva, dado o seu amplo espectro de actividade (Sousa 2006). Diversos estudos tem mostrado baixas taxas de resistência ao antibiótico amicacina em *P.aeruginosa*, (Henwood *et al.* 2001; Van Eldere 2003; Cavallo *et al.* 2007; Reinert *et al.* 2007; Majdi *et al.* 2008).

É sabido que no tratamento de infecções provocadas por *P. aeruginosa*, a mono terapia aumenta as probabilidades de selecção de mutantes resistentes. Em infecções graves é recomendada a combinação de aminoglicosídeos com um  $\beta$ -lactâmico ou uma quinolona como sendo a escolha terapêutica mais adequada na terapia empírica (Raja and Singh 2007).

### 3. Integrões

A resistência de alguns isolados clínicos para a maioria dos antibióticos existentes parece estar a crescer contribuindo, para isso a presença de integrões que transportam cassetes de gene, que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos (Livermore 2002).

A pesquisa do gene da integrase de classe 1, nos 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, revelou 14 (33.3%) estirpes positivas para a presença deste gene. A amplificação das zonas variáveis e posterior determinação da sequência nucleotídica revelou a presença de 8 integrões distintos.

### 4. Caracterização Dos Integrões

O conhecimento dos genes que constituem as zonas não conservadas dos integrões é essencial para a caracterização destes elementos. A amplificação das regiões variáveis e posterior determinação da sequência nucleotídica, dos 14 isolados para a qual a pesquisa do gene da integrase de classe 1 foi positivo, revelou a presença de 8 integrões distintos (Tabela 8).



Tabela 8 - Isolados positivos para a presença de integrões de classe 1, genes cassette amplificados e respectivo tamanho do “array”.

Amostra	Cassetes de gene	Tamanho do “array”
<b>Pa2, Pa37</b>	<i>aacA7 – Cm1A1</i>	1900pb
<b>Pa4</b>	<i>aacA7 – bla<sub>VIM-2</sub> – aacA4</i>	2300pb
<b>Pa6; Pa32; Pa38</b>	<i>aac(6')-Ib – bla<sub>PSE</sub> – aadA2</i>	3000pb
<b>Pa14</b>	<i>aadB – orf1 – aadA11</i>	1800pb
<b>Pa23; Pa26</b>	<i>aacA8 – bla<sub>OXA-2</sub> – aadA7 – aadA6 – orfD</i>	4000pb
<b>Pa30; Pa34; Pa39</b>	<i>bla<sub>VIM-2</sub> – aadA1</i>	2000pb
<b>Pa31</b>	<i>aadA6 – orfD</i>	1300pb
<b>Pa35</b>	<i>aacA4</i>	900pb

### • Estirpe Pa31

A estirpe Pa 31 foi isolada a partir de uma amostra de pús de um doente internado no serviço de cirurgia.

Na estirpe Pa31 foi detectada a presença do integrão In97 (número de acesso FJ752628, GenBank) contendo um gene de resistência a antibióticos (*aadA6*) e o gene *orfD* que codifica uma proteína de função desconhecida, na sua região variável (figura 8).

O integrão In97 foi descrito, em *P. aeruginosa*, em dois países da América latina nomeadamente México e Brasil e na China. Estes resultados mostram a sua ampla dispersão geográfica.

O gene *aadA6*, codifica uma aminoglicosídeo-adeniltransferase que confere resistência a aminoglicosídeos como a estreptomicina e a espectinomicina. A susceptibilidade a estes agentes antimicrobianos não foi testada, uma vez que estes não fazem parte da carta AST-N022, pelo que não conseguimos concluir se o gene contido no integrão está ou não a contribuir para a resistência a esses compostos.

O antibiótico estreptomicina é activo contra bacilos de Gram negativo aeróbios/anaeróbios facultativos e algumas estirpes de *S. aureus*. Dado o facto que as estirpes bacterianas adquirem facilmente resistência à estreptomicina, o seu uso clínico é bastante limitado, sendo utilizada praticamente no tratamento da tuberculose, endocardite bacteriana, brucelose e nas infecções provocadas por *F. tularensis* e *Y. pestis* (Sousa 2006).

Embora o antibiótico espectinomicina tenha actividade contra diversas espécies bacterianas, só é utilizada na terapêutica contra *N. gonorrhoeae* (Sousa 2006).

Pela análise do fenótipo de resistências verifica-se que não poderá ser o mecanismo responsável pela resistência da estirpe Pa31, uma vez que apresenta resistência a todos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados e o integrão não possui genes de resistência a estes compostos.



Figura 8 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão In97 presente na estirpe Pa31.

### • Estirpe Pa35

A estirpe Pa35 foi isolada a partir de uma amostra de expectoração de um doente do internado no serviço de medicina III.

Na estirpe Pa35 foi detectada a presença de um integrão (número de acesso FJ715945, GenBank) contendo um gene de resistência a antibióticos na sua região variável (figura 9). A determinação da sequência nucleotídica revelou que adjacente à região conservada 5' se encontra o gene *aacA4*, o qual codifica uma aminoglicosídeo 6'-N-acetiltransferase, que confere resistência aos aminoglicosídeos, tais como a gentamicina e canamicina.

Este integrão foi também descrito, em *P. aeruginosa* na China. O gene *aacA4* está frequentemente associado a diversos “arrays” de outros integrações.

Pela análise do fenótipo de resistências, seria de esperar que o isolado fosse resistente à gentamicina uma vez que, o gene *aacA4* confere resistência a este antibiótico. No entanto, a estirpe Pa35 apresentou susceptibilidade a todos aminoglicosídeos testados incluindo a gentamicina, o que leva a sugerir que a expressão do gene possa não estar ocorrer. A susceptibilidade ao antibiótico canamicina não é testada pela carta AST-N022, visto este ser bactericida contra bacilos de Gram negativo e *S. aureus*, contudo não tem praticamente actividade contra *P. aeruginosa* (Sousa 2006).

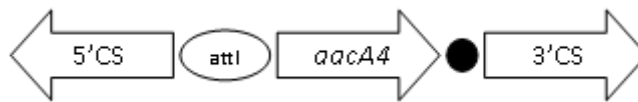


Figura 9 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão presente na estirpe Pa35.

### • Estirpe Pa14

A estirpe Pa14 foi isolada a partir de uma amostra de expectoração de um doente do internado no serviço de medicina I.

Na estirpe Pa14 foi detectada a presença do integrão In2345 (número de acesso FJ715944, GenBank) contendo três cassetes de genes na sua região variável (figura 10).

O integrão In2345 foi descrito, num isolado clínico de *P. aeruginosa* multi-resistente, em França por Llanes et al, em 2005. Contudo, esta é a primeira descrição deste integrão em Portugal.

A determinação da sequência nucleotídica da região variável revelou que adjacente à região conservada 5' se encontra o gene *aadB* que codifica uma aminoglicosídeo-adeniltransferase a qual confere resistência aos aminoglicosídeos, tais como a gentamicina, canamicina e tobramicina. O gene *aadA11* está adjacente à região conservada 3', codifica uma aminoglicosídeo-adeniltransferase a qual confere resistência aos aminoglicosídeos como a estreptomicina e a espectinomicina. Na zona intermédia, entre estes dois genes encontra-se o gene *orf1* que codifica uma proteína de função desconhecida.

O isolado clínico Pa14 apresenta resistência aos aminoglicosídeos gentamicina, tobramicina e netilmicina, sendo sensível à amicacina e isepamicina. O integrão In2345 poderá estar envolvido na resistência aos aminoglicosídeos apresentada pela estirpe Pa14, no entanto não será o único mecanismo de resistência presente visto que esta estirpe apresentou igualmente resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos testados, à excepção dos carbapenemos.

Em algumas estirpes bacterianas, os mecanismos de resistência podem co-existir tornando-as multi-resistentes aos antibióticos. Em ambiente hospitalar devido ao grande consumo de antibióticos, podemos encontrar bactérias com múltiplos mecanismos de resistência, como aquisição de vários genes de resistência e a mutações que conferem resistência a múltiplos antibióticos (por alteração dos alvos do antibiótico, alteração da permeabilidade e mecanismos de efluxo)(Machado 2004).

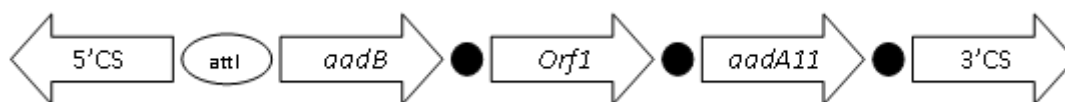


Figura 10 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão In2345 presente na estirpe Pa14.

### • Estirpes Pa2 e Pa37

A estirpe Pa2 foi isolada a partir de uma hemocultura de um doente do proveniente do serviço de urgência. A estirpe Pa37 foi isolada a partir de uma amostra de pús de um doente do internado no serviço de especialidades médicas.

Nas estirpes Pa2 e Pa37 foi detectada a presença de um integrão (número de acesso FJ715943, GenBank) contendo dois genes de resistência a antibióticos na sua região variável (figura 11).

Este integrão foi descrito na China num isolado clínico de *P. aeruginosa*, uma vez mais mostrando a disseminação global deste tipo de estruturas.

O gene de resistência a antibióticos encontra-se imediatamente adjacente à região conservada 5', codifica uma aminoglicosídeo 6'-N-acetiltransferase do tipo Ib que confere resistência a aminoglicosídeos como a amicacina, tobramicina e netilmicina, designado por *aacA7*. O gene *Cm1A1* está adjacente à região conservada 3', codifica uma cloranfenicol-acetiltransferase a qual confere resistência ao cloranfenicol. Trata-se de um antibiótico inibidor da síntese proteica actuando na subunidade 50S. O facto de provocar efeitos secundários graves irreversíveis, nomeadamente anemias aplásticas e trombocitopenias, tem limitado a sua utilização. Contudo o cloranfenicol é utilizado na alimentação animal como promotor de crescimento (Sousa 2006). Pela análise do fenótipo de resistência verifica-se que ambas a estirpes apresentam resistência aos aminoglicosídeos, podendo o integrão estar a contribuir para essa resistência.

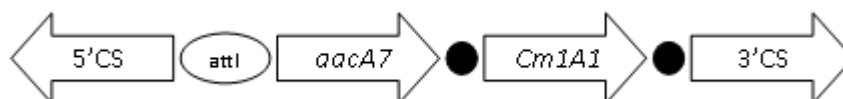


Figura 11 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão presente nas estirpes Pa2 e Pa37.

## • Estirpe Pa4

A estirpe Pa4 foi isolada a partir de uma amostra de urina de um doente do serviço de urgência.

Na estirpe Pa4 foi detectada a presença do integrão In103 (número de acesso AY954726, GenBank) contendo três cassetes de genes na sua região variável (figura 12).

O integrão In103 foi descrito em 2005, num isolado de *P. aeruginosa*, no Porto por Quinteira e Peixe.

A determinação da sequência nucleotídica da região variável revelou que adjacente à região conservada 5' se encontra um gene que confere resistência aos aminoglicosídeos, tais como amicacina, tobramicina e netilmicina, designado por *aacA7*. O gene *aacA4* está adjacente à região conservada 3', o qual confere resistência aos aminoglicosídeos, tais como a gentamicina e canamicina. Na zona intermédia, entre estes 2 genes encontra-se o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* que codifica para uma metalo- $\beta$ -lactamase, VIM-2, que hidrolisa os carbapenemos.

A estirpe Pa4 apenas apresentou susceptibilidade à piperacilina. Nos últimos anos tem sido observada uma maior incidência de bacilos de Gram negativo resistentes a cefalosporinas de espectro alargado em ambiente hospitalar, conduzindo a um aumento da utilização de  $\beta$ -lactâmicos mais potentes, como os carbapenemos. Actualmente os carbapenemos constituem uma das principais opções terapêuticas para o tratamento de infecções nosocomiais. Os carbapenemos são antibióticos de largo espectro, com excelente permeabilidade, penetrando através de canais de porina específicos OprD, boa estabilidade às  $\beta$ -lactamases, e forte ligação a PBPs essenciais. A maior utilização de carbapenemos em ambiente hospitalar tem favorecido a selecção de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a estes antibióticos. As metalo- $\beta$ -lactamases são enzimas com capacidade de hidrólise de todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenemos, com excepção dos monobactâmicos (Mendes *et al.* 2006).

Na Europa a metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 é o subtipo dominante, tendo sido detectada em isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos em diversos estudos realizados em Portugal (Cardoso *et al.* 2002; Quinteira *et al.* 2005; Quinteira and Peixe 2006; Cardoso *et al.* 2008; Pena *et al.* 2008).

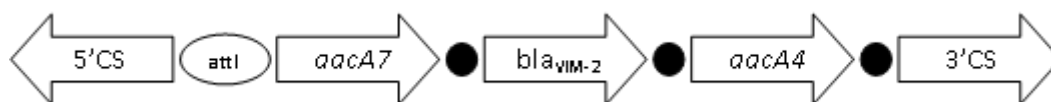


Figura 12 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão In103 presente na estirpe Pa4.

### • Estirpes Pa30, Pa34 e Pa39

As estirpes Pa30, Pa34 e Pa39 foram isoladas a partir de amostras de urina. As estirpes Pa30 e Pa39 foram isoladas de doentes do serviço de urgência e a estirpe Pa34 de um doente internado no serviço de medicina III.

Nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* Pa30, Pa34 e Pa39 foi detectada a presença do integrão (número de acesso FJ752629, GenBank), contendo na sua região variável duas cassetes de gene distintas (figura 13). O gene *bla<sub>VIM-2</sub>* encontra-se adjacente à região conservada 5', codifica uma metalo-β-lactamase, VIM-2. O gene *aadA1* adjacente à região conservada 3' codifica uma aminoglicosídeo 3'-adeniltransferase que confere resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente espectinomicina e estreptomicina.

Este integrão foi descrito na Rússia num isolado clínico de *P. aeruginosa* por Shevchenko e colaboradores (2006).

Pela análise do fenótipo de resistências verifica-se que a presença deste integrão poderá ser um dos mecanismos responsáveis pela resistência observada. As estirpes Pa30 e Pa39 apresentam susceptibilidade apenas ao meropenemo, amicacina e isepamicina. A estirpe Pa34 apenas apresenta susceptibilidade à amicacina e isepamicina.

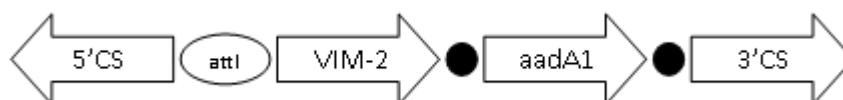


Figura 13 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão presente nas estirpes Pa30, Pa34 e Pa39.

### • Estirpes Pa6, Pa32 e Pa38

As estirpes Pa6, Pa32 e Pa38 foram isoladas a partir de amostras de urina. As estirpes Pa32 e Pa38 foram isoladas de doentes do serviço de urgência e a estirpe Pa6 de um doente internado no serviço de medicina I.

Nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* Pa6, Pa32 e Pa38 foi detectada a presença do integrão designado por In99 (número de acesso DQ219465, GenBank), contendo na sua região variável três cassetes de gene distintas (figura 15). O gene *aac(6')-Ib* encontra-se adjacente à região conservada 5', codifica uma 6'-N-acetiltransferase do tipo II que confere resistência aos aminoglicosídeos, tais como gentamicina, tobramicina e netilmicina. O gene *aadA2* encontra-se adjacente à região conservada 3' que confere resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente espectinomicina e estreptomicina. O gene *aadA2* é o gene mais frequente em integrões de classe 1, facto que pode estar relacionado com o aparecimento precoce de integrões contendo genes *aadA*, uma vez que a disponibilidade clínica estreptomicina e consequente aumento da pressão selectiva precedeu o de outros aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos (Quinteira *et al.* 2005). Na zona intermédia, entre estes dois genes encontra-se o gene *bla<sub>PSE</sub>*, o qual confere resistência aos antibióticos ampicilina e carbenicilina.

Pela análise do fenótipo de resistências verifica-se que as três estirpes apresentam perfis de resistência diferentes contudo, todas são resistentes à gentamicina, netilmicina, tobramicina e às penicilinas, pelo que a presença deste integrão poderá estar envolvido na resistência destas estirpes.

Este integrão foi descrito por Caetano e colaboradores (2006), tendo sido isolado de três estirpes isoladas em 2003 e em cinco estirpes isoladas em 2005 no HIP, Aveiro. O facto de voltar a surgir significa que a sua disseminação permanece no ambiente hospitalar/comunidade. Das 12 estirpes isoladas no HIP, Aveiro, contendo o In99 apenas 2 (Pa19 e Pa20) isoladas em 2003 são clones, o que sugere que a sua disseminação poderá ocorrer por transferência horizontal de genes na comunidade local (figura 14).

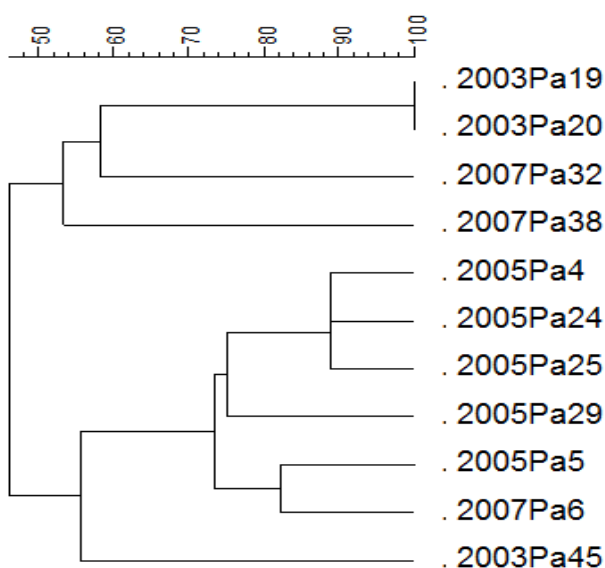


Figura 14 - Dendrograma resultante dos padrões de BOX-PCR dos isolados com integração In99 utilizando o coeficiente de similaridade de Dice.

A sequência nucleotídica do In99 é semelhante à do In100, descrito num isolado clínico de *P. aeruginosa* em Coimbra (Quinteira *et al.* 2005; Caetano *et al.* 2007). Contudo, o In100 contém um cassette de gene adicional *bla<sub>VIM-2</sub>*, localizado entre a região conservada 5' e o gene *aac(6')-Ib*. O arranjo dos cassetes de genes do In100 sugere que o In99 poderá ter sido o seu precursor. Ambos os integreiros foram descritos em Portugal em cidades próximas, justificando a troca de material genético entre estirpes na comunidade e consequentemente em doentes hospitalizados (Caetano *et al.* 2007). No entanto o In99 foi descrito em Itália por Edalucci e colaboradores (2008) o que vem evidenciar uma ampla distribuição destas estruturas genéticas (Edalucci *et al.* 2008).

Quinteira e colaboradores (2005) detectaram o integreiro In99 numa estirpe de *P. aeruginosa* isolada de um porco. O uso de antibióticos como suplementos na ração de animais é prática comum à escala mundial, de forma a promover um maior e mais rápido crescimento dos animais. O uso e abuso destas substâncias na agropecuária conduz a um aumento da selecção e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos (Caetano *et al.* 2007).





Figura 15 -Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão In99 presente nas estirpes Pa6, Pa32 e Pa38.

### • Estirpes Pa23 e Pa26

A estirpe Pa23 foi isolada a partir de uma hemocultura de um doente do serviço de urgência. A estirpe Pa26 foi isolada a partir de uma amostra de pus de um doente internado no serviço de medicina intensiva.

Nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* Pa23 e Pa26 foi detectada a presença do integrão designado por In78 (número de acesso AY444814, GenBank) (figura 16).

O integrão In78 foi descrito em 2005, num isolado de *P. aeruginosa*, na Índia por Daniel Aubert.

A determinação da sequência nucleotídica da região variável revelou que adjacente à região conservada 5' se encontra um gene que confere resistência aos aminoglicosídeos, tais como amicacina, tobramicina e netilmicina, designado por *aacA8*, seguido do gene *bla<sub>OXA-2</sub>*. Este gene codifica para uma β-lactamase da classe D, OXA-2. As β-lactamases conferem resistência a ampicilina, cefalotina, oxacilina e cloxacilina, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e encontram-se principalmente em *P.aeruginosa* (Bhattacharjee *et al.* 2007). A montante deste gene encontram-se dois genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, o gene *aacA7* (confere resistência à amicacina, tobramicina e netilmicina) e o gene *aadA6* (confere resistência a estreptomicina e a espectinomicina). O gene *orfD* está adjacente à região conservada 3', que codifica uma proteína de função desconhecida.

Pela análise do fenótipo de resistências verifica-se que a presença deste integrão poderá não ser o único mecanismo responsável pela resistência das estirpes Pa23 e Pa26, uma vez que estas apresentam resistência a todos os antibióticos testados com exceção da colistina.

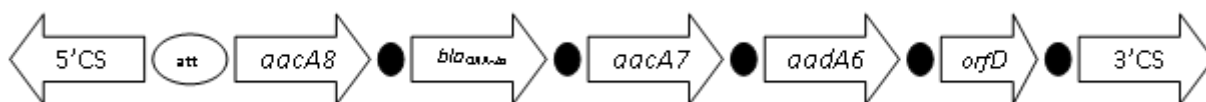


Figura 16 - Esquema representativo dos genes e estruturas genéticas que constituem o integrão In78 presente nas estirpes Pa23 e Pa26.

## 5 Genotipagem

As infecções nosocomiais constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade no meio hospitalar. Quando ocorre um surto infeccioso, a detecção da origem da infecção assim como a relação entre estirpes isoladas é essencial para a implementação de medidas adequadas para minimizar a sua transmissão e disseminação (Singh *et al.* 2006).

A tipagem genética dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* contendo integrões de classe 1, recorrendo à técnica BOX-PCR, permitiu obter os perfis genéticos dos isolados em estudo. Utilizando o programa informático GelCompar II foi possível obter o respectivo dendrograma. O dendrograma obtido mostra que estamos na presença de estirpes distintas (Figura 17).

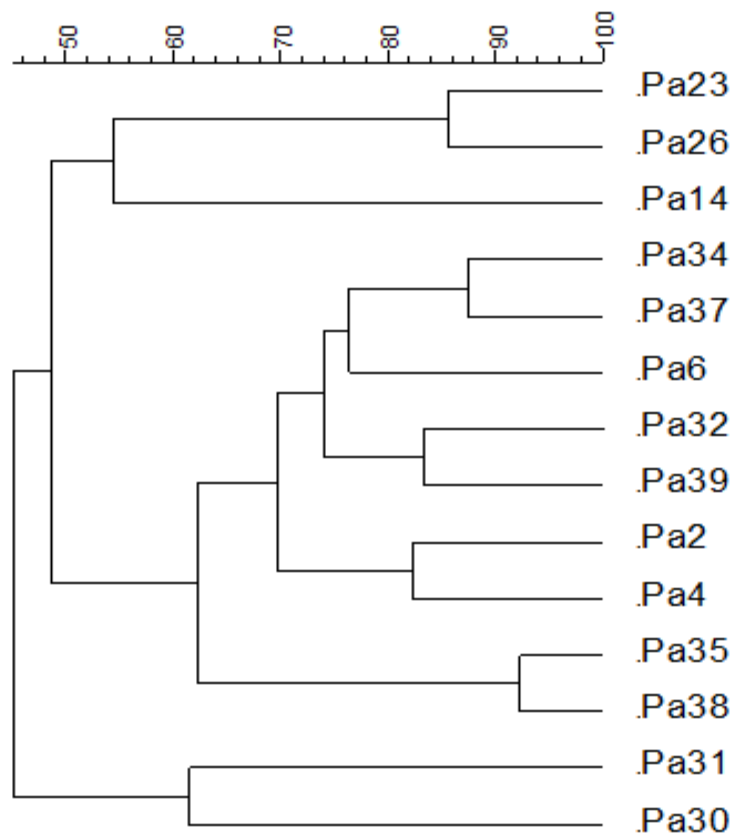


Figura 17 - Dendrograma resultante dos padrões de BOX-PCR dos isolados com integreões utilizando o coeficiente de similaridade de Dice.

# Conclusões

---

Os isolados de *P. aeruginosa* do presente estudo foram obtidos principalmente a partir de doentes internados, sendo 83.3% das amostras estudadas pertencentes a indivíduos com idades superiores a 60 anos. A expectoração foi o produto biológico mais representativo.

No presente estudo, assim como no relatório anual de 2008 do serviço de Microbiologia do HIP Aveiro, a amicacina revelou ser o antimicrobiano com melhor actividade para tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Relativamente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, os carbapenemos foram os que apresentaram melhor actividade. De salientar a elevada resistência observada para as penicilinas e quinolonas. *P.aeruginosa* é um patogénico oportunista responsável por grande número de infecções na comunidade e nosocomiais. Torna-se essencial a análise periódica das susceptibilidades, de modo a fornecer uma orientação para a escolha empírica da terapia antimicrobiana.

Tendo em conta os objectivos propostos podemos concluir que:

1. A pesquisa de integções de classe 1 revelou que 33.3 % dos isolados clínicos distintos contendo genes de resistência ao cloranfenicol, aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos. Os resultados mostraram ainda a presença de genes de metalo- $\beta$ -lactamases VIM-2, que foram identificados em integções de 4 isolados, alertando para a possível disseminação destes genes. De referir o preocupante facto, de 50% destes integções ter sido detectado em estirpes isoladas de pacientes do serviço de urgência. Embora se deva ter em conta a possibilidade

de estes pacientes terem tido um episódio prévio de internamento, onde poderão ter adquirido este isolado, não pode ser excluída a hipótese de origem na comunidade. O que torna o cenário de disseminação ainda mais preocupante.

2. A tipagem molecular mostrou que a população em estudo não é clonal. A análise periódica dos determinantes de resistência assim como o conhecimento da sua epidemiologia, em cada hospital, é essencial para o controlo da sua disseminação.
3. O integrão In99 foi isolado no HIP Aveiro, em estirpes isoladas em 2003, 2005 e novamente em 3 estirpes do presente estudo, o que sugere a sua persistência no ambiente hospitalar/comunidade.

# Referências

---

- Aloush, V., S. Navon-Venezia, et al. (2006). "Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact." Antimicrob. Agents Chemother. **50**(1): 43-48.
- Álvares, C., A. Castro, et al. (2005). "Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo." Rev Fac Univ Med Nac Colombia **53**(1).
- Alves, A., I. Henriques, et al. (2003). "Tipagem Genética de Microrganismos." from <http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf>.
- Ball, P. (2000). "Quinolone generations: natural history or natural selection?" J. Antimicrob. Chemother. **46**(suppl\_3): 17-24.
- Barlow, R. S., J. M. Pemberton, et al. (2004). "Isolation and Characterization of Integron-Containing Bacteria without Antibiotic Selection." Antimicrob. Agents Chemother. **48**(3): 838-842.
- Bebrone, C. (2007). "Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily." biochemical pharmacology **74**: 168 6 – 1701.
- Bennett, P. M. (1999). "Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria." J. Antimicrob. Chemother. **43**(1): 1-4.
- Bhattacharjee, A., M. R. Sen, et al. (2007). "Detection of OXA-2 group extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from India." J. Antimicrob. Chemother. **60**(3): 703-704.
- Bradford, P. A. (2001). "Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat." Clin. Microbiol. Rev. **14**(4): 933-951.
- Brown, H. J., H. W. Stokes, et al. (1996). "The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives." J. Bacteriol. **178**(15): 4429-4437.
- Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995). "A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob. Agents Chemother. **39**(6): 1211-1233.
- Caetano, T., S. Ferreira, et al. (2007). "In99, an In100-related integron, its occurrence and prevalence in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains from a central region of Portugal." Epidemiology and Infection **135**(03): 502-504.
- Caldeira, L. (2009). "Os aminoglicosídeos revisitados." Infeção e Sepsis(5): 17-19.
- Carattoli, A. (2001). "Importance of integrons in the diffusion of resistance." Veterinary Research **32**: 243-259.
- Carattoli, A. (2001). "Importance of integrons in the diffusion of resistance." Vet. Res. **32**(3-4): 243-259.
- Cardoso, O., A. F. Alves, et al. (2007). "Surveillance of antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a central hospital in Portugal." Jornal of Antimicrobial Chemotherapy **56**(62).
- Cardoso, O., R. Leitão, et al. (2002). "Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-2 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal." Microbial Drug Resistance **8**(2): 93-97.
- Cavallo, J. D., D. Hocquet, et al. (2007). "Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study." J. Antimicrob. Chemother. **59**(5): 1021-1024.
- Collis, C. M. and R. M. Hall (1992). "Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase." J. Bacteriol. **174**(5): 1574-1585.

- Collis, C. M. and R. M. Hall (1995). "Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons." Antimicrob. Agents Chemother. **39**(1): 155-162.
- Correia, M., F. Boavida, et al. (2003). "Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrob. Agents Chemother. **47**(9): 2838-2843.
- Delgado, M. C. G., A.D. García-Mayorgas, et al. (2007). "Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos." Rev Esp Quimioterap **Vol. 20** (2): 230-233.
- Dubois, V. r., C. Debreyer, et al. (2009). "In Vitro Recombination Catalyzed by Bacterial Class 1 Integron Integrase IntI1 Involves Cooperative Binding and Specific Oligomeric Intermediates." PLoS ONE **4**(4): e5228.
- Edalucci, E., R. Spinelli, et al. (2008). "Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*." Clinical Microbiology and Infection **14**(1): 88-90.
- Emmerson, A. M. and A. M. Jones (2003). "The quinolones: decades of development and use." J. Antimicrob. Chemother. **51**(suppl\_1): 13-20.
- Ferech, M., S. Coenen, et al. (2006). "European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **58**: 423-427.
- Fluit, A. C. and F. J. Schmitz (2004). "Resistance integrons and super-integrons." Clinical Microbiology & Infection **10**(4): 272-288.
- Fonceca, A., C. Sebastião, et al. (2004). Orientações Para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA).
- Foxman, B., L. Zhang, et al. (2005). "Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies." Epidemiologic Perspectives & Innovations **2**(1): 10.
- Gupta Sachin, Govil Deepak, et al. (2009). "Colistin and polymyxin B: A re-emergence." Indian Journal of Pathology and Microbiology **13** (2): 49-53.
- Hanberger, H., J.-A. Garcia-Rodriguez, et al. (1999). "Antibiotic Susceptibility Among Aerobic Gram-negative Bacilli in Intensive Care Units in 5 European Countries." JAMA **281**(1): 67-71.
- Henwood, C. J., D. M. Livermore, et al. (2001). "Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test." J. Antimicrob. Chemother. **47**(6): 789-799.
- Kasper, D. L., E. Braunwald, et al. (2005). Harrison's Principles of internal medicine. New York, McGraw-Hil.
- Kim, H. B., C. H. Park, et al. (2009). "Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period." Antimicrob. Agents Chemother. **53**(2): 639-645.
- L. Poirel, J. Rodriguez-Martinez, et al. (2009). Characterisation of blaDIM-1, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. ESCMID. Helsinki.
- Lee, K., J. H. Yum, et al. (2005). "Novel Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaSIM-1, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(11): 4485-4491.
- Levesque, C., L. Piche, et al. (1995). "PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes." Antimicrob. Agents Chemother. **39**(1): 185-191.
- Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin. Microbiol. Rev. **8**(4): 557-584.
- Livermore, D. M. (2001). "Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems." J. Antimicrob. Chemother. **47**(3): 247-250.
- Livermore, David M. (2002). "Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?" Clinical Infectious Diseases **34**(5): 634-640.
- Lupski, J. R. and G. M. Weinstock (1992). "Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes." J. Bacteriol. **174**(14): 4525-4529.
- Machado, C. M. S. (2004). "Resistência aos antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica." Revista de la OFIL **14**(1): 45-68.
- Magnet, S. and J. S. Blanchard (2004). "Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance." Chemical Reviews **105**(2): 477-498.
- Majdi, N. A.-H., W. W. John, et al. (2008). "Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: A Population-Based Study." The American journal of medicine **121**(8): 702-708.
- Martin, B., O. Humbert, et al. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucl. Acids Res. **20**(13): 3479-3483.

- Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, et al. (1999). "Many Class I Integrans Comprise Distinct Stable Structures Occurring in Different Species of Enterobacteriaceae Isolated from Widespread Geographic Regions in Europe." Antimicrob. Agents Chemother. **43**(3): 686-689.
- Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, et al. (1998). "Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds." J. Antimicrob. Chemother. **42**(6): 689-696.
- Martins, F., J. Teixeira, et al. (2008). "Avaliação do perfil de susceptibilidade de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no serviço de Microbiologia do Hospital Geral de Santo António, EPE num período de 3 anos (2004-2006)." REVISTA PORTUGUESA DE SAÚDE PÚBLICA **26**(2).
- Mazel, D., B. Dychinco, et al. (1998). "A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome." Science **280**(5363): 605-608.
- Mendes, R. E., M. Castanheira, et al. (2006). "Metallo- $\beta$ -lactamases." Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial **42**: 103-113.
- Minarini, L. A. R., L. Poirel, et al. (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil." J. Antimicrob. Chemother. **62**(3): 474-478.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Tenover, R. C., Tenover, R. H., Ed. (2007). Manual of clinical microbiology: Volumes 1 and 2. Washington, D.C., ASM PRESS.
- Nogueira, A. M. (1998). "Pneumonias nosocomiais." Medicina Interna **5**(3).
- Nordmann, P. and L. Poirel (2005). "Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae." J. Antimicrob. Chemother. **56**(3): 463-469.
- O. Cardoso, A. Alves, et al. (2008). "Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient." International Journal of Antimicrobial Agents **31**(4).
- Olive, D. M. and P. Bean (1999). "Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms." J. Clin. Microbiol. **37**(6): 1661-1669.
- Paterson, David L. (2006). "The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species." Clinical Infectious Diseases **43**(s2): S43-S48.
- Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, et al. (1993). "The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants." Antimicrob. Agents Chemother. **37**(4): 761-768.
- Pena, A., A. Donato, et al. (2008). "Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in a central hospital from Portugal." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **27**(12): 1269-1271.
- Pitout, J. D. D., B. L. Chow, et al. (2007). "Molecular Epidemiology of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Emergence of VIM-2-Producing Isolates." J. Clin. Microbiol. **45**(2): 294-298.
- Prescott L., Klein D. (1999). Microbiology, WCB McGraw-Hill.
- Queenan, A. M. and K. Bush (2007). "Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases." Clin. Microbiol. Rev. **20**(3): 440-458.
- Quinteira, S. and L. Peixe (2006). "Multiniche Screening Reveals the Clinically Relevant Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Far from the Hospital Setting: an Ongoing Dispersion Process?" Appl. Environ. Microbiol. **72**(5): 3743-3745.
- Quinteira, S., J. C. Sousa, et al. (2005). "Characterization of In100, a New Integron Carrying a Metallo- $\beta$ -Lactamase and a Carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(1): 451-453.
- Rademaker, J. and F. Bruijn. (1997). "Characterization and Classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis." from <https://www.msu.edu/~debruijn/dna1-4.htm>.
- Raja, N. S. and N. N. Singh (2007). "Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital." Journal Of Microbiology, Immunology and Infection **40**(1): 45-49.
- Recchia, G. D. and R. M. Hall (1995). "Gene cassettes: a new class of mobile element." Microbiology **141**(12): 3015-3027.
- Reinert, R. R., D. E. Low, et al. (2007). "Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline." J. Antimicrob. Chemother. **60**(5): 1018-1029.
- Ruiz, J. (2003). "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." J. Antimicrob. Chemother. **51**(5): 1109-1117.
- Sá-Correia, I., Ed. (2000). Microbiologia. Pseudomonadaceae. *Pseudomonas*. Lisboa, Lidel Edições Técnicas.



- Sá-Correia, I. (2005, 2007). "Observação microscópica de bactérias - coloração de Gram." from <http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=306>.
- Sánchez-Romero, E. Cercenado, et al. (2007). "Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: Second National Study (2003)." *Rev Esp Quimioterap* **20**(2): 222-229.
- Singh, A., R. V. Goering, et al. (2006). "Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection." *Clin. Microbiol. Rev.* **19**(3): 512-530.
- Sousa, J. C. d. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*, Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Stehling, E. G., W. D. d. Silveira, et al. (2008). Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **12**: 86-88.
- Suárez, C. and F. Gudiol (2009). "Beta-lactam Antibiotics." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **27**(2): 116-129.
- Todar, K. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Todar's Online Textbook of Bacteriology.
- Toleman, M. A., D. Biedenbach, et al. (2003). "Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme." *J. Antimicrob. Chemother.* **52**(4): 583-590.
- Toleman, M. A., D. Biedenbach, et al. (2005). "Italian metallo- $\beta$ -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme." *J. Antimicrob. Chemother.* **55**(1): 61-70.
- Vakulenko, S. B. and S. Mobashery (2003). "Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future." *Clin. Microbiol. Rev.* **16**(3): 430-450.
- Van Eldere, J. (2003). "Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections." *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(2): 347-352.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, et al. (2003). "Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program." *J. Antimicrob. Chemother.* **52**(1): 116-119.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, et al. (2005). "Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm?" *Clin. Microbiol. Rev.* **18**(2): 306-325.
- Wommer, S., S. Rival, et al. (2002). "Substrate-activated Zinc Binding of Metallo- $\beta$ -lactamases. PHYSIOLOGICAL IMPORTANCE OF THE MONONUCLEAR ENZYMES." *J. Biol. Chem.* **277**(27): 24142-24147.
- Zavascki, A. P., L. Z. Goldani, et al. (2007). "Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review." *J. Antimicrob. Chemother.* **60**(6): 1206-1215.